

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**CHRISTIANE TREVISAN SLIVINSKI**

**PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448  
EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO  
DE CANA E OKARA COMO SUBSTRATO**

**CURITIBA  
2012**

**CHRISTIANE TREVISAN SLIVINSKI**

**PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448  
EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO  
DE CANA E OKARA COMO SUBSTRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como  
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em  
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Co-orientadora: Prof(a). Dr(a). Nadia Krieger

**CURITIBA  
2012**

## TERMO DE APROVAÇÃO

CHRISTIANE TREVISAN SLIVINSKI

### **PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA E OKARA COMO SUBSTRATO**

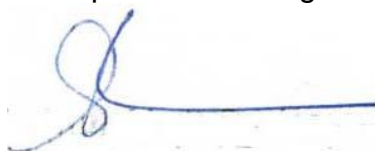
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. David Alexander Mitchell (Orientador)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Jaime Paba  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof(a). Dr(a). Maria Benincasa Vidotti  
Universidade Estadual Paulista - UNESP



Prof(a). Dr(a). Denise Maria Guimarães Freire  
Departamento de Bioquímica – UFRJ



Prof. Dr. Jonas Contiero  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Curitiba, 25 de julho de 2012.

Dedico este trabalho aos grandes responsáveis por tudo. Meus pontos de apoio. Meus anjos da guarda. Foram vocês que me ampararam em todos os momentos difíceis e me deram a estrutura necessária para que corajosamente eu pudesse chegar ao final.

**“Pai e Mãe, Amo vocês”**

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade da vida e de vivê-la intensamente;

Ao meu orientador, Prof. Dr. David Alexander Mitchell,  
por seu espírito científico, sua orientação, confiança e apoio no desenvolvimento  
deste trabalho e principalmente por toda a ajuda com o artigo e com o inglês;

À minha co-orientadora, Prof(a). Dr(a). Nadia Krieger,  
pela confiança, paciência e pela maneira como orientou meus passos, contribuindo  
para o meu crescimento pessoal e intelectual;

Ao amigo e meu tutor em Aracaju, Prof. Dr. Álvaro Silva Lima,  
por sua ajuda, orientação, amizade e confiança. Sua força e dedicação sempre  
serão exemplos em minha vida. Obrigado por ter me recebido tão carinhosamente;

À Prof(a). Dr(a). Sara Cuadros Orellana,  
pela pronta ajuda e orientação nos experimentos em Aracaju;

À Prof(a). Dr(a). Cleide Mara Faria Soares,  
pelo incentivo e apoio em todos os momentos em que estive na UNIT em Aracaju;

Ao Prof. Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira (Departamento de Química UFPR),  
pela orientação, ajuda e colaboração nos experimentos em HPLC;

Ao Prof. Dr. Jesus Cordova,  
pela orientação e ajuda com o biorreator de colunas;

Ao Dr. Lauro Mera de Souza (Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR),  
pelo auxílio nas análises de espectrometria de massa;

Ao colega Prof. Dr. Doumit Camilios Neto,  
por todas as conversas, discussões e auxílio no planejamento dos experimentos;

Aos alunos de Iniciação Científica Alex Vinícius Lopes Machado, Paola Paludo,  
Fernanda Marchesini, Andrei Ferreira Pinto, Edgar Mallmann, Rodrigo Simas,  
que colaboraram grandemente para a execução deste trabalho;

Ao colega de doutorado Wellington Balmant,  
pela ajuda com os ajustes no biorreator de colunas e nos cálculos de respirometria;

Ao meu pai Pedro,  
exemplo de dedicação, perseverança e responsabilidade. Obrigado por acreditar em  
mim. Seu incentivo e apoio foram fundamentais para a conclusão deste trabalho;

À minha mãe Deise,  
por toda sua dedicação, confiança e apoio. Exemplo de força e otimismo. Sem sua  
ajuda, amparo e amor eu não teria tido forças para ir em frente;

À minha irmã Luciana, meu cunhado João Alexandre e  
minhas pituquinhas amadas Nathalia e Maria Luysa,  
obrigado pelo amor incondicional de todos vocês. Pelo incentivo, apoio e  
compreensão. Amo vocês;

À querida e grande amiga Prof(a). Dr(a). Verônica Sierpe,  
que tão carinhosamente me recebeu em sua casa em Aracaju. Serei eternamente  
grata por tudo que você fez por mim. Você e todos os “*pets*” moram em um  
lugarzinho especial em meu coração;

Às minhas grandes amigas Leonete e Viviane,  
por todas as nossas conversas, reflexões e desabafos. Obrigada por vocês estarem  
sempre ao meu lado, me amparando nos momentos difíceis e comemorando comigo  
minhas conquistas. Vocês fazem toda a diferença;

Aos amigos Kátia, Diniara, Rodrigo Zawadzki, Trajano e Priscilla,  
vocês me ofereceram muito mais que um ombro amigo. Muito obrigada pelo apoio,  
amparo e companhia. Vocês não me deixaram desanimar, desistir. Serei  
eternamente grata por tudo que vocês representaram e representam em minha vida;

À todos os meus queridos amigos que já fizeram parte do grupo de pesquisa do  
Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise e aos que ainda persistem:  
Alessandra Baron, Alessandra Biz, Alex, Alexandra, Aline, Alysson (Café), Andrei,  
Arnaldo, Arquimedes, Bárbara, Bianca, Carol, Cryshelen, Cristiane, Daniele,  
Dayane, Diniara, Doumit, Edgar, Érika, Fernanda Marchesini, Fernanda Miyuki,  
Francine, Jessica, Jonas, Juliana Caraça, Juliane, Keyla, Lídia, Marcelo, Kátia,  
Paola, Robson, Rodrigo Simas, Rodrigo Zawadzki, Thaís, Vanda, Vivian e Viviane.  
Obrigada por vocês tornarem essa caminhada absolutamente mais agradável;

À todos os colegas do NPDEAS,  
obrigada por toda a ajuda e colaboração. Sem o esforço de vocês, a conclusão  
deste trabalho teria sido bem mais difícil;

À todos os amigos e colegas da Bioquímica e da Química,  
pelo apoio e incentivo. Juntos fazemos parte de uma grande família;

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica,  
em especial à Prof(a). Dr(a). Joana Silveira, Prof. Dr. Guilherme Sassaki e Prof. Dr.  
Jaime Paba, pelo acompanhamento do desenvolvimento deste trabalho e correção  
dos manuscritos, desde o projeto até a versão final;

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica,  
Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá e Prof(a). Dr(a). Silvia Cadena  
por toda dedicação e empenho, estimulando sempre o espírito científico e tonando  
possível o desenvolvimento do trabalho de todos;

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro;

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal  
e científico.

*“Aquele que cede ante ao obstáculo, que desiste diante da dificuldade já perdeu a batalha sem a ter enfrentado. Não raro, o obstáculo e a dificuldade são mais aparentes que reais. Mais ameaçadores do que impeditivos. Só se pode avaliar após o enfrentamento. Ademais, cada vitória conseguida se torna aprimoramento da forma de vencer e cada derrota ensina a maneira como não se deve tentar a luta. Essa conquista é proporcionada mediante o esforço de prosseguir sem desfalecimento e insistir após cada pequeno ou grande insucesso. O objetivo deve ser conquistado, e, para tanto, a coragem do esforço contínuo é indispensável. Muitas vezes será necessário parar para refletir, recuar para renovar forças e avançar sempre. É uma salutar estratégia aquela que faculta perder agora o que é de pequena monta para ganhar resultados permanentes e de valor expressivo depois.”*

*Joana De Ângelis*

## RESUMO

Nos últimos anos, os biosurfactantes têm atraído atenção devido a sua baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e boa aceitabilidade ecológica. As aplicações destes compostos estendem-se às indústrias petrolífera, alimentícia, farmacêutica, entre outras. Os lipopeptídeos, em especial a surfactina, têm sido muito estudados para aplicações na área da saúde. Entretanto, a utilização destes compostos é limitada devido ao seu alto custo de produção. Este trabalho teve por objetivo desenvolver um processo para a produção de lipopeptídeos por fermentação em estado sólido (FES), gerando dados em escala de laboratório que forneçam a base para futuros estudos de aumento de escala. Inicialmente, foi realizado um *screening* com a intenção de encontrar uma nova cepa com capacidade para produção de lipopeptídeos. A cepa SALPETRO 2D foi isolada a partir de solo contaminado com petróleo e identificada como *Bacillus* sp. O sobrenadante de uma cultura submersa utilizando glicerol como fonte de carbono teve a sua tensão superficial reduzida de 41,2 para 27,7 mN.m<sup>-1</sup> e apresentou um índice de emulsificação após 24 h (E<sub>24</sub>) de 55 % para óleo de motor. Em um estudo comparativo entre *Bacillus* sp. e *B. pumilus* UFPEDA 448 para a seleção do microrganismo a ser utilizado em FES, a cepa de *B. pumilus* mostrou-se mais eficiente na produção de biosurfactante, tal como determinado por quantificação indireta por diluição micelar crítica (DMC), técnica que representa o número de diluições necessárias para se alcançar a concentração micelar crítica (CMC). Usando um substrato à base de uma mistura de okara (resíduo sólido da extração do leite de soja) e bagaço de cana (usado como *bulking agent*), os extratos aquosos das culturas realizadas com *B. pumilus* e *Bacillus* sp apresentaram valores de DMC de 32 e 16 respectivamente. O biosurfactante produzido por *B. pumilus* já era conhecido como sendo um lipopeptídeo composto de uma mistura de homólogos de surfactina, o que facilitou sua quantificação por HPLC. A melhor produção de surfactina por *B. pumilus* ocorreu em uma mistura 50:50 de okara e bagaço de cana, em massa. Devida a relativamente alta produção de proteases em FES, a pré-hidrólise do okara com protease não aumentou os níveis de surfactina. A temperatura ótima para a produção de surfactina foi de 37 °C, sendo que a temperatura de incubação afeta a razão dos vários homólogos de surfactina produzidos. O cultivo em biorreator de coluna com aeração forçada sob condições otimizadas forneceu um nível de surfactina de 809 mg.L-SU<sup>-1</sup> (solução umedecedora), o que corresponde a 3,3 g.kg-SS<sup>-1</sup> (sólido seco). Este é o maior nível de surfactina produzida até o momento em FES com um microrganismo não recombinante. A velocidade máxima de captação de O<sub>2</sub> de 20 mmol min<sup>-1</sup>.kg-SS<sup>-1</sup> corresponde a velocidade de produção de calor metabólico de 182 W.kg-SS<sup>-1</sup>. As propriedades tensoativas da surfactina foram semelhantes as relatadas na literatura para a surfactina produzida por fermentação submersa (FS). Estes resultados sugerem que poderia ser viável a utilização de FES para a produção de surfactina, mas atenção especial deve ser dada em larga escala para a remoção de calor.

Palavras-chave: lipopeptídeos, surfactina, *Bacillus*, fermentação em estado sólido, okara, bagaço de cana



## ABSTRACT

Over recent years, biosurfactants have attracted attention due to their low toxicity, high biodegradability and good ecological acceptability. Biosurfactants find applications in the petroleum, food and pharmaceutical industries, amongst others. Lipopeptides, especially surfactin, have been extensively studied for applications in the health industry. However, the use of these compounds is limited due to their high production costs. The objective of the present work was to develop a process for the production of lipopeptides by solid-state fermentation (SSF), generating data at laboratory scale that would provide the basis for future scale-up studies. Initially, a screening was undertaken with the intention of finding a new strain with the capacity to produce lipopeptides. The strain SALPETRO 2D was isolated from soil contaminated with petroleum and was identified as *Bacillus* sp. The supernatant of a submerged culture using glycerol as a carbon source had its superficial tension reduced from 41.2 to 27.7 mN m<sup>-1</sup> and gave a 24-h emulsification index (E<sub>24</sub>) of 55% for motor oil. In a comparative study between *Bacillus* sp. and *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 for the selection of a strain to be used in SSF, *B. pumilus* was a more efficient producer of biosurfactant, as determined by the indirect critical micellar dilution (CMD) technique, which represents the number of two-fold dilutions necessary to reach the critical micellar concentration. Using a substrate based on a mixture of okara (the solid residue that remains after the extraction of soy milk from soybeans) and sugarcane bagasse (used as a bulking agent), aqueous extracts of the cultures undertaken with *B. pumilus* and *Bacillus* sp. gave CMD values of 32 and 16, respectively. The biosurfactant produced by *B. pumilus* was already known to be a mixture of homologues of surfactin, which facilitated its quantification by HPLC. Surfactin production by *B. pumilus* was best on a 50:50 mixture of okara and sugarcane bagasse, by mass. Due to the relatively high production of proteases in SSF, a proteolytic pretreatment of okara did not increase surfactin levels. The optimum temperature for surfactin production was 37 °C, with the incubation temperature affecting the ratios of the various surfactin homologues. Cultivation in a packed-bed bioreactor with forced aeration under optimized conditions gave a surfactin level of 809 mg L-IS<sup>-1</sup> (impregnating solution), which corresponds to 3.3 g kg-DS<sup>-1</sup> (dry solids). This is the highest level of surfactin that has been produced to date in SSF with a non-recombinant organism. The maximum O<sub>2</sub> uptake rate of 20 mmol min<sup>-1</sup> kg-SS<sup>-1</sup> corresponds to a rate of production of waste metabolic heat of 182 W kg-SS<sup>-1</sup>. The tensioactive properties of the surfactin produced in SSF were similar to those reported in the literature for surfactin produced by submerged fermentation. These results suggest that SSF can be used for the production of surfactin, but at large scale special attention will need to be given to heat removal.

Keywords: lipopeptides, surfactin, *Bacillus*, solid-state fermentation, okara, sugarcane bagasse

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– FÓRMULA ESTRUTURAL DE UMA MOLÉCULA DE SURFACTANTE .....	23
FIGURA 2	– DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA VARIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS (TENSÃO SUPERFICIAL, INTERFACIAL E SOLUBILIDADE) DO COMPOSTO ORGÂNICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SURFACTANTE .....	24
FIGURA 3	– ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS DOS PRINCIPAIS BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS .....	28
FIGURA 4	– SUBDIVISÕES DOS LIPOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>Bacillus subtilis</i> .....	32
FIGURA 5	– ESTRUTURA DO PRINCIPAL HOMÓLOGO ( <i>iso</i> -C <sub>15</sub> ) DA SURFACTINA .....	33
FIGURA 6	– ESTRUTURA DO PRINCIPAL HOMÓLOGO ( <i>n</i> -C <sub>14</sub> ) DA ITURINA .....	34
FIGURA 7	– ESTRUTURA DO HOMÓLOGO <i>n</i> -C <sub>16</sub> DA FENGICINA .....	35
FIGURA 8	– MODELO DE REGULAÇÃO PARA EXPRESSÃO DOS GENES DAS ENZIMAS DE SÍNTESE DA SURFACTINA .....	39
FIGURA 9	– BIOSÍNTESE DA SURFACTINA .....	41
FIGURA 10	– SETORES DE APLICAÇÃO E PROPRIEDADES EXPLORADAS DE SURFACTINA .....	42
FIGURA 11	– PONTO DE COLETA DE MICRORGANISMOS .....	52
FIGURA 12	– ILUSTRAÇÃO DE UMA COLUNA DE RAIMBAULT PREENCHIDA COM BAGAÇO DE CANA E OKARA E ENCAIXADA NO UMIDIFICADOR .....	61
FIGURA 13	– ESQUEMA DO BIORREATOR DE COLUNAS DE RAIMBAULT .....	61
FIGURA 14	– MICRORGANISMOS ISOLADOS DE ÁGUA PRODUZIDA (1) E SOLO (2) .....	69

FIGURA 15	– SUBSTRATOS SÓLIDOS TESTADOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	74
FIGURA 16	– DETERMINAÇÃO DOS HOMÓLOGOS PRESENTES NO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 .....	77
FIGURA 17	– PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPLC DOS CINCO HOMÓLOGOS DO LIPOPEPTÍDEO EM ESTUDO .....	78
FIGURA 18	– CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO DE SURFACTINA .....	79
FIGURA 19	– EFEITO DA ADIÇÃO DE OKARA HIDROLISADO NA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM MEIO SALINO MINERAL COM GLICEROL EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	80
FIGURA 20	– EFEITO DA ADIÇÃO DE OKARA HIDROLISADO NA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM MEIO SALINO MINERAL COM GLICEROL EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO .....	81
FIGURA 21	– ATIVIDADE DE PROTEASE DURANTE O CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	82
FIGURA 22	– ATIVIDADE DE PROTEASE DURANTE O CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO ....	82
FIGURA 23	– EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE SURFACTINA DE <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	84
FIGURA 24	– EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE HOMÓLOGOS DE SURFACTINA DE <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO ....	85
FIGURA 25	– CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM COLUNAS DE RAIMBAULT .....	87
FIGURA 26	– SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	93

FIGURA 27	– CINÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS, USANDO COLUNAS DE RAIMBAULT .....	94
FIGURA 28	– PERFIL DE RESPIROMETRIA DE <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 DURANTE A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM COLUNAS DE RAIMBAULT .....	97
FIGURA 29	– DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA A PARTIR DE DILUIÇÕES SÉRIAS DE SOLUÇÃO AQUOSA DE SURFACTINA PRODUZIDA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM COLUNAS DE RAIMBAULT .....	100
FIGURA 30	– ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO ( $E_{24}$ )% FRENTE A DIFERENTES HIDROCARBONETOS E ÓLEOS VEGETAIS DA SOLUÇÃO AQUOSA DO LIPOPETÍDEO PRODUZIDO POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	105

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– RAMOS INDUSTRIAIS DE APLICAÇÃO DE SURFACTANTES E BIOSURFACTANTES .....	25
TABELA 2	– PRINCIPAIS GRUPOS DE SURFACTANTES DE ORIGEM NATURAL E SINTÉTICA .....	26
TABELA 3	– PRINCIPAIS CLASSES DE BIOSURFACTANTES E MICRORGANISMOS PRODUTORES .....	27
TABELA 4	– SEQUÊNCIA DE PEPTÍDEOS E CADEIA DE ÁCIDOS GRAXOS DAS DIFERENTES VARIANTES DE CADA FAMÍLIA DE LIPOPEPTÍDEO DE <i>Bacillus</i> spp .....	31
TABELA 5	– PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	47
TABELA 6	– SUBSTRATOS SÓLIDOS E MISTURAS DE SUBSTRATOS SÓLIDOS UTILIZADOS NAS FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO .....	56
TABELA 7	– TESTE DO COLAPSO DA GOTA PARA OS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA CONTAMINADOS COM PETRÓLEO .....	70
TABELA 8	– ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO DOS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA CONTAMINADAS COM PETRÓLEO UTILIZANDO GLICEROL E GLUCOSE COMO FONTE DE CARBONO .....	71
TABELA 9	– TENSÃO SUPERFICIAL DOS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO .....	71
TABELA 10	– TENSÃO SUPERFICIAL DOS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA UTILIZANDO GLUCOSE COMO FONTE DE CARBONO .....	72
TABELA 11	– MEDIDA DOS VALORES DE TENSÃO SUPERFICIAL E DILUIÇÃO MICELAR CRÍTICA DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA A SELEÇÃO DE SUBSTRATO SÓLIDO .....	74

TABELA 12	– VARIAÇÕES NO MEIO DE CULTIVO CONTROLE PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	88
TABELA 13	– DELINEAMENTO FATORIAL UTILIZADO PARA OTIMIZAR AS CONDIÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 .....	92
TABELA 14	– ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS OBTIDOS PELO DELINEAMENTO FATORIAL .....	92
TABELA 15	– RENDIMENTO DE LIPOPEPTÍDEOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM DIFERENTES CEPAS DE <i>Bacillus</i> .....	95
TABELA 16	– DETERMINAÇÃO DA POROSIDADE DO LEITO DE FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE OKARA E BAGAÇO DE CANA .....	99
TABELA 17	– DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL DA SURFACTINA SUBMETIDA AO TRATAMENTO TÉRMICO....	101
TABELA 18	– DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL DA SURFACTINA SUBMETIDA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO .....	102
TABELA 19	– DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL DA SURFACTINA SUBMETIDA À VARIAÇÃO DE pH .....	103
TABELA 20	– PROPRIEDADES TENSOATIVAS DE LIPOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR CEPAS DE <i>Bacillus</i> .....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS

BH – Bushnell Hass  
BTA – brometo de trimetil amônio  
CMC – concentração micelar crítica  
CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas  
CoA – coenzima A  
D-Ala – D-alanina  
D-*allo*-Thr – D-*allo*-treonina  
D-Asn – D-asparagina  
D-Leu – D-leucina  
DMC – diluição micelar crítica  
D.O.<sub>600</sub> – densidade óptica em 600 nm  
D-Orn – D-ornitina  
D-Tyr – D-tirosina  
ε - porosidade  
EIS ou ESI-MS – espectrometria de massa com ionização por eletrospray  
FACL – ácido graxo CoA ligase  
FES – fermentação no estado sólido  
FS – fermentação submersa  
GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa  
GH – grau de hidrólise  
L-Asn – L-asparagina  
L-Asp – L-aspartato  
LB-Miler – Luria-Bertani Miler  
L-Gln – L-glutamina  
L-Glu – L-glutamato  
L-Ile – L-isoleucina  
L-Leu – L-leucina  
L-Pro – L-prolina  
L-Ser – L-serina  
LTyr – L-tirosina  
L-Val – L-valina  
MEOR – recuperação melhorada do petróleo  
NRPS – sintetases de peptídeos não ribossomais  
OKH – okara hidrolisado  
OKNH – okara não hidrolisado  
PCP – proteína carreadora de peptidil  
SDS – dodecil sulfato de sódio  
SS – sólido seco  
SU – solução umedecedora  
SUm – sólido úmido  
TCA – ácido tricloroacético  
TI – tensão interfacial  
TS – tensão superficial  
TSA –ágar tripticaseína de soja

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 JUSTIFICATIVA .....	21
2.2 OBJETIVO GERAL .....	21
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
3.1 SURFACTANTES .....	23
3.2 BIOSURFACTANTES .....	26
3.2.1 Lipopeptídeos .....	29
3.2.1.1 Lipopeptídeos de <i>Bacillus pumilus</i> .....	36
3.2.2 Surfactina .....	37
3.2.2.1 Propriedades físico-químicas da surfactina .....	37
3.2.2.2 Biossíntese de surfactina .....	38
3.2.2.3 Aplicações de surfactina .....	41
3.3 PRODUÇÃO DE SURFACTINA .....	43
3.3.1 Processos fermentativos .....	43
3.3.1.1 Produção de surfactina por fermentação submersa .....	45
3.3.1.2 Produção de surfactina por fermentação em estado sólido .....	46
3.3.1.2.1 Estudos de ampliação de escala para a produção de lipopeptídeos .....	48
3.3.1.2.2 Uso de okara na produção de lipopeptídeos .....	49
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTE .....	51
4.1.1 Identificação dos locais de coleta .....	51
4.1.2 Isolamento das cepas .....	52
4.1.3 Manutenção das cepas .....	53
4.1.4 Coloração de Gram .....	53
4.1.5 <i>Screening</i> das cepas produtoras de biosurfactante .....	53
4.1.5.1 Preparo do pré-inóculo .....	54
4.1.5.2 Fermentação submersa em meio salino mineral .....	54
4.1.6 Identificação da cepa selecionada .....	54
4.2 SELEÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	55
4.2.1 Microrganismos utilizados .....	55
4.2.2 Meio e condições de cultivo para fermentação em estado sólido .....	55
4.2.3 Extração do biosurfactante do sólido fermentado .....	56
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO .....	56
4.3.1 Efeito da adição de hidrolisados protéicos no meio de fermentação .....	57
4.3.1.1 Meio e condições de cultivo para fermentação submersa e fermentação em estado sólido .....	57
4.3.1.2 Hidrólise enzimática das proteínas do okara .....	58
4.3.1.3 Medida da atividade de protease .....	58
4.3.2 Efeito da composição da solução umedecedora .....	59



4.3.3 Efeito das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio .....	59
4.3.4 Efeito da razão entre os substratos sólidos .....	59
4.3.5 Otimização da produção de surfactina por metodologia de superfície de resposta em colunas de Raimbault .....	60
4.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM COLUNAS DE RAIMBAULT .....	60
4.5 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TENSOATIVAS DA SURFACTINA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	62
4.5.1 Determinação da concentração micelar crítica .....	62
4.5.2 Efeito do tratamento térmico nas propriedades tensoativas da surfactina .....	62
4.5.3 Efeito da força iônica nas propriedades tensoativas da surfactina .....	62
4.5.4 Efeito do pH nas propriedades tensoativas da surfactina .....	63
4.5.5 Propriedade emulsificante .....	63
4.6 METODOLOGIA ANALÍTICA .....	63
4.6.1 Curva de crescimento dos microrganismos utilizados .....	63
4.6.2 Contagem de células .....	64
4.6.3 Teste do colapso da gota .....	64
4.6.4 Determinação da tensão superficial .....	64
4.6.5 Determinação da diluição micelar crítica .....	65
4.6.6 Medida do índice de emulsificação .....	65
4.6.7 Determinação da umidade dos substratos sólidos .....	65
4.6.8 Extração orgânica do lipopeptídeo .....	66
4.6.9 Quantificação do lipopeptídeo .....	66
4.6.10 Espectrometria de massa com ionização por eletrospray .....	67
4.6.11 Determinação do grau de hidrólise das proteínas do okara .....	68
4.6.12 Determinação da porosidade do leito de fermentação .....	68
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTE .....	69
5.1.1 Isolamento de microrganismos de fontes contaminadas com petróleo .....	69
5.1.2 <i>Screening</i> das cepas para produção de biosurfactantes .....	70
5.2 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO E DO MICRORGANISMO PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	73
5.2.1 Microrganismo selecionado .....	76
5.3 QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA .....	77
5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO .....	79
5.4.1 Efeito da pré-hidrólise do okara na produção de surfactina .....	79
5.4.2 Efeito da temperatura na produção de surfactina por <i>Bacillus pumilus</i> em fermentação em estado sólido .....	83
5.4.3 Cinética de produção de surfactina em colunas de Raimbault .....	86
5.4.4 Efeito na variação da composição do meio de cultivo controle na produção de surfactina por <i>Bacillus pumilus</i> em fermentação em estado sólido .....	87
5.4.4.1 Efeito da composição da solução umedecedora .....	88
5.4.4.2 Efeito das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio .....	89
5.4.4.3 Efeito da proporção dos substratos sólidos .....	90
5.4.5 Otimização da produção de surfactina por metodologia de superfície de resposta em colunas de Raimbault .....	91
5.4.6 Cinética de produção de surfactina em colunas de Raimbault nas condições otimizadas .....	93

5.4.7 Obtenção de dados de respirometria .....	96
5.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS EM LARGA ESCALA .....	98
5.6 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TENSOATIVAS DA SURFACTINA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	99
5.6.1 Determinação da concentração micelar crítica .....	99
5.6.2 Efeito do tratamento térmico nas propriedades tensoativas da surfactina .....	100
5.6.3 Efeito da força iônica nas propriedades tensoativas da surfactina .....	101
5.6.4 Efeito do pH nas propriedades tensoativas da surfactina .....	102
5.6.5 Propriedade emulsificante .....	104
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>106</b>
<b>7 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>108</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICE A - CURVA DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS EM ESTUDO .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO A – IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS .....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO B – DADOS DA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MOLECULAR DA SURFACTINA PRODUZIDA POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO C – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO OKARA E DO BAGAÇO DE CANA .....</b>	<b>139</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Biosurfactantes são compostos anfifílicos produzidos por organismos vivos, predominantemente microrganismos, com propriedades de emulsificação, umedecimento, solubilização, detergência, lubrificação, capacidade molhante, capacidade espumante e dispersão de fases (MULLIGAN; YOUNG; GIBBS, 2001). Os tipos de biosurfactantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos (LANG, 2002). Em comparação com os surfactantes sintetizados quimicamente, os biosurfactantes têm as vantagens de possuírem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, sendo ativos em extremos de temperatura, pH e salinidade (DESAI; BANAT, 1997). Outra vantagem é que eles podem ser produzidos a partir de recursos renováveis (NITSCHKE *et al.*, 2005). Como resultado destas vantagens, os biosurfactantes têm sido considerados para utilização em diversos setores industriais, incluindo a indústria de petróleo, alimentos e farmacêutica.

Os lipopeptídeos estão entre os biosurfactantes mais eficientes (ZAJIC; SEFFENS, 1984). Eles são compostos de peptídeos ligados a ácidos graxos, com a porção peptídica sendo muitas vezes cíclica, com uma carga neutra ou negativa (MAIER, 2003). Os lipopeptídeos melhor caracterizados são aqueles produzidos por espécies de *Bacillus*, incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtillisina e bacilomicina (STELLER; VATER, 2000; MAIER, 2003). Apresentam atividade contra fungos, bactérias, vírus, micoplasmas e tumores, ou podem atuar como imunomoduladores ou inibidores enzimáticos (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968; CAMEOTRA; MAKAR, 2004), o que lhes confere um grande interesse em sua utilização para aplicações terapêuticas. Lipopeptídeos ainda podem ser utilizados em biorremediação, extração de petróleo, entre outras aplicações.

Entre os lipopeptídeos mais estudados encontra-se a surfactina, (STEIN, 2005), que é particularmente atraente para várias aplicações farmacêuticas que incluem: a inibição da formação de coágulos de fibrina, indução de canais iônicos em membranas de bicamada lipídica, inibição de  $H^+/K^+$ -ATPase, inibição de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), inibição da agregação plaquetária e inibição de fosfolipase A2 citosólica, bem como atividade antiviral, antitumoral e antiinflamatória (KIM *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2006). A surfactina tem baixa

toxicidade para células de mamíferos, o que significa que pode potencialmente ser utilizada em terapias trombolíticas (RODRIGUES *et al.*, 2006).

A surfactina está disponível comercialmente pela Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, USA) apenas em quantidades necessárias para análises químicas (porções de 10 e 50 mg), sendo produzida por fermentação submersa (FS), utilizando uma cepa de *Bacillus subtilis*. No entanto, seu alto custo significa que seu uso seria proibitivo em aplicações que requerem quantidades em gramas ou quilogramas. Uma possível estratégia para reduzir os custos da surfactina, é a produção por fermentação em estado sólido (FES), utilizando resíduos agroindustriais como substratos (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

Alguns estudos têm sido realizados para a produção de surfactina utilizando diferentes cepas de *Bacillus* cultivadas em FES em farelo de trigo ou okara como substrato (OHNO; ANO; SHODA, 1995a, 1995b; BUGAY, 2009), lembrando que Bugay é integrante do Grupo de Produção e Caracterização de Biosurfactantes Produzidos por Cepas Microbianas Nativas, coordenado pelos professores David Alexander Mitchell e Nadia Krieger, na Universidade Federal do Paraná (UFPR). O substrato mais utilizado para a produção de lipopetídeos por FES, o okara, é um resíduo sólido gerado durante a produção do leite de soja. Embora contenha 25% de proteínas, a maior parte destas proteínas são insolúveis, o que dificulta sua utilização (O'TOOLE, 1999). Vários autores têm relatado que a suplementação com aminoácidos livres aumenta a produção de surfactina em FS (KLUGE *et al.*, 1988; PEYPOUX; MICHEL, 1992; BESSON; MICHEL, 1998; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). Assim, uma das propostas desta tese foi estudar o efeito da pré-hidrólise do okara com protease, disponibilizando peptídeos menores e aminoácidos livres.

A utilização do okara em FES ainda pode trazer outras limitações ao rendimento da surfactina obtida, pois este substrato apresenta uma tendência em formar uma massa compacta durante o processo de FES, o que tornaria a transferência de calor e massa muito difícil em um biorreator em larga escala (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003). Uma alternativa a esta situação seria a utilização de um *bulking agent*, um material sólido que é misturado com o substrato primário sólido. Esta estratégia permite a obtenção de um leito com maior porosidade e consequentemente favorece os fenômenos de transporte no interior do

leito (VEENANADIG; GOWTHAMAN; KARANTH, 2000). Camilios Neto *et al.* (2011, 2008), também integrante do Grupo de Produção e Caracterização de Biosurfactantes Produzidos por Cepas Microbianas Nativas da UFPR, obtiveram bons resultados para a produção do biosurfactante ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* através da adição de bagaço de cana como um *bulking agent* no meio sólido a base de farinha de semente de girassol e farelo de milho. Sendo assim, a adição de bagaço de cana como *bulking agent* ao okara utilizado como substrato sólido poderia elevar os níveis da produção de surfactina.

Dentro deste contexto, inicialmente, procurou-se por novas cepas com alto potencial para produção de biosurfactantes e a seleção de substratos para a FES. Em um segundo momento, foi utilizada a cepa de *Bacillus pumilus* UFPEDA 448, isolada de cana de açúcar, que já havia apresentado produção de surfactina A. Foi investigada se a produção de surfactina em FES utilizando okara poderia ser melhorada, em primeiro lugar por uma etapa de pré-hidrólise e em segundo lugar, pela adição de bagaço de cana como *bulking agent*. Foram realizados estudos da produção de surfactina em biorreator de colunas com aeração forçada fornecendo dados de respirometria que podem servir para traçar estratégias viáveis de remoção de calor. Finalmente foram avaliadas as propriedades de superfície da surfactina produzida em FES.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2.1 JUSTIFICATIVA

Existem poucos processos industriais para a produção e comercialização de lipopeptídeos, sendo que aqueles existentes normalmente são conduzidos em meios sintéticos através de FS, agregando altos custos ao produto final. Neste contexto, a FES apresenta inúmeras vantagens em relação à FS, principalmente com relação aos substratos utilizados. O baixo consumo de água no processo somado a utilização de resíduos agroindustriais, podem ser um fator determinante para a diminuição de custos. Já são encontrados na literatura alguns trabalhos que citam a utilização de okara e farelo de trigo que se mostraram adequados para a produção de lipopeptídeos por FES. Porém, quando estes substratos são utilizados isoladamente, dificulta a ampliação de escala do sistema, pois são materiais pouco porosos que promovem uma alta compactação do leito de fermentação, interferindo de forma negativa no processo de transferência de calor e massa.

Levando-se em consideração a gama de possíveis aplicações para os lipopeptídeos (Figura 9, p. 41), bem como a necessidade de estudos de ampliação de escala para a produção destes compostos, os objetivos deste trabalho são apresentados a seguir.

### 2.2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo para produção de surfactina por FES.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um *screening* para seleção de novas cepas para produção de biosurfactantes;
- Verificar o potencial de okara como substrato para produção de surfactina por FES;
- Implementar metodologia de quantificação da surfactina produzida;
- Estudar a utilização de hidrolisados protéicos para a produção de surfactina;

- Otimizar os parâmetros de fermentação em escala de bancada: temperatura, umidade e porosidade do substrato e a adição de suplementos ao meio de cultivo;
- Avaliar a produção de surfactina por FES em biorreator de colunas de Raimbault;
- Obter dados de respirometria que possam servir para traçar estratégias viáveis de remoção de calor;
- Determinar a cinética de respirometria do microrganismo e produção de surfactina;
- Determinar as propriedades tensoativas da surfactina produzida.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 SURFACTANTES

Os surfactantes, também chamados de tensoativos, emulsificantes ou agentes de interface, são moléculas anfipáticas, ou seja, são constituídos de um domínio hidrofóbico e de um domínio hidrofílico, com atividade de diminuição de tensão superficial e interfacial em soluções aquosas (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001). A parte polar ou hidrofílica de um surfactante é conhecida como “cabeça” e a porção hidrofóbica ou apolar é conhecida como “cauda” (HABBA, *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2000; MANNERAT, 2005). A Figura 1 ilustra a estrutura simplificada de um surfactante.

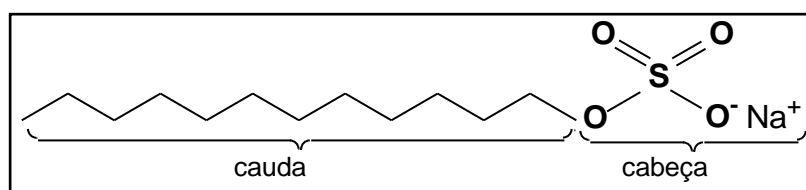


FIGURA 1. FÓRMULA ESTRUTURAL DE UMA MOLÉCULA DE SURFACTANTE – dodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio (SDS).  
FONTE: A AUTORA.

A eficiência de um surfactante é avaliada em função das propriedades da molécula em si e de sua interação com a água, como solubilidade, concentração micelar crítica (CMC), tensão superficial (TS) e tensão interfacial (TI). A Figura 2 mostra a relação entre a concentração do surfactante e suas propriedades físicas. Em um meio onde estão presentes duas fases imiscíveis, quanto maior a concentração do surfactante, menor os valores da TS e TI, contudo, observa-se um pequeno aumento na solubilidade dos componentes da mistura. A concentração de surfactante necessária para reduzir a TS e TI é limitada. É alcançado um ponto onde aumentos subsequentes na concentração do surfactante não correspondem a novas alterações na TS e TI, atingindo o que se chama de concentração micelar crítica (CMC). Neste ponto observa-se que as moléculas de surfactante estão organizadas em micelas e interagem com as fases da mistura formando sistemas coloidais.

Em um sistema coloidal (incluindo as emulsões), onde existe uma interface entre duas fases imiscíveis, os surfactantes concentram-se nas interfaces sólido-



líquido, líquido-líquido ou vapor-líquido. A parte hidrofóbica da molécula concentra-se na interface voltada à fase hidrofóbica, enquanto a porção hidrofílica está orientada para a interface da fase hidrofílica (MULLIGAN, 2005).

As tensões superficial e interfacial referem-se ao posicionamento das moléculas nas interfaces ar/líquido e líquido/líquido respectivamente com uma orientação específica também conhecida como adsorção. A CMC é definida como a máxima concentração de surfactante com propriedades tensoativas onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas que conferirá as propriedades de detergência e solubilização do composto. Esse parâmetro indica se o surfactante é um bom redutor de tensão superficial, quanto menor é o valor de CMC, maior a eficiência do surfactante (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; MULLIGAN, 2005).

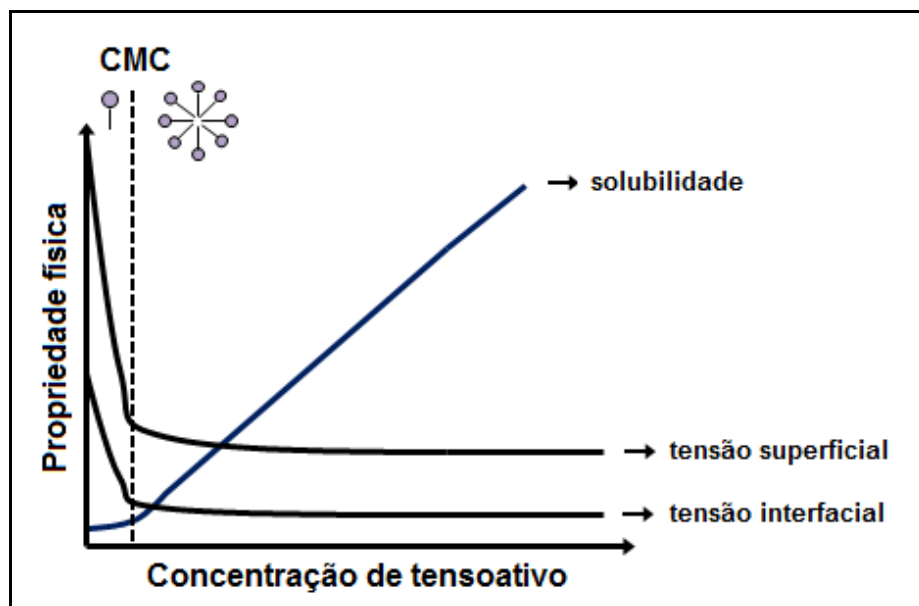


FIGURA 2. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA VARIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICAS (TENSÃO SUPERFICIAL, INTERFACIAL E SOLUBILIDADE) DO COMPOSTO ORGÂNICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SURFACTANTE. (CMC: concentração micelar crítica).  
 FONTE: Adaptada de MULLIGAN, YOUNG e GIBBS (2001).

A eficácia de um surfactante é determinada por sua habilidade em diminuir a tensão superficial da água. Um surfactante eficaz pode reduzir a tensão superficial da água destilada a 25 °C de 72 mN.m<sup>-1</sup> a valores inferiores a 30 mN.m<sup>-1</sup>. A capacidade de redução da tensão superficial de um surfactante pode ser influenciada pelo pH, pela temperatura e pela força iônica da solução (SAMSON *et al.*, 1990; OBERBREMER; MULLER-HURTIG; WAGNER, 1990).

Os surfactantes são utilizados em quase todos os setores da indústria moderna, como pode ser observado na Tabela 1 (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; MULLIGAN, 2009). A maior parte dos surfactantes disponíveis comercialmente é de origem química, sendo principalmente produzidos a partir de derivados de petróleo (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

TABELA 1. RAMOS INDUSTRIAIS DE APLICAÇÃO DE SURFACTANTES E BIOSURFACTANTES.

RAMO INDUSTRIAL	APLICAÇÃO	FUNÇÃO DO SURFACTANTE
<b>Petróleo</b>	Recuperação melhorada de petróleo (MEOR)	Redução da viscosidade de óleos, recuperação de óleo residual
	De-emulsificação	De-emulsificação de emulsões, solubilização, redução da viscosidade, agente umectante
<b>Ambiental</b>	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos, agente sequestrante de metais
	Remediação ( <i>soil washing, soil flushing</i> )	Emulsificação por aderência ao hidrocarboneto, dispersante, agente espumante, detergente
<b>Biológico</b>	Ingrediente funcional	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos, agente protetor
	Microbiologia	Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular
	Farmacêutica	Ação anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-viral, agentes penetrantes e umectantes
<b>Agricultura</b>	Biocontrole	Facilita mecanismos associados ao microrganismo como parasitismo, competição, resistência sistêmica induzida e hipo-virulência
<b>Cosmética</b>	Cosméticos	Emulsificantes, agentes de espuma, solubilizadores, umectantes, agentes de limpeza
<b>Alimentos</b>	Alimentos	Emulsificantes e dispersantes

FONTE: Adaptada de SINGH, VAN HAMME e WARD (2007).

Entre as possíveis aplicações dos surfactantes, duas se destacam pelo alto potencial e pela importância da aplicação: (1) utilização em limpeza de derramamento de óleo e outros compostos hidrofóbicos (BANAT, 1995; MULLIGAN, 2005; BORDOLOI; KONWAR, 2009) e (2) utilização para aumentar a recuperação de óleo (petróleo) em reservatórios (BANAT, 1995). Nestas duas aplicações o uso de surfactantes de origem biológica é mais apropriado, uma vez que surfactantes químicos podem ser tóxicos ao meio ambiente (WEI; CHOU; CHANG, 2005). Além disto, os subprodutos de síntese de surfactantes químicos são potencialmente nocivos ao meio-ambiente (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

### 3.2 BIOSURFACTANTES

A importância da preservação ambiental, combinada com novas legislações de controle do meio ambiente, levou à procura por surfactantes naturais, os chamados biosurfactantes, como alternativas aos produtos comerciais existentes (Tabela 2) (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

TABELA 2. PRINCIPAIS GRUPOS DE SURFACTANTES DE ORIGEM NATURAL E SINTÉTICA.

NATURAIS	SINTÉTICOS
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biosurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaína
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

FONTE: NITSCHKE e PASTORE (2002).

Os biosurfactantes podem ser obtidos de plantas, animais, bactérias, fungos ou leveduras. Os microrganismos são os principais produtores, e podem utilizar estes compostos extra ou intracelularmente, com a finalidade de facilitar a difusão passiva de substâncias insolúveis em água, como por exemplo, hidrocarbonetos, para o interior da célula. A síntese de biosurfactantes é essencial para a sobrevivência dos organismos produtores (HOLMBERG, 2001).

Embora a exata função biológica dos biosurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas das principais funções fisiológicas atribuídas a eles incluem a emulsificação e a solubilização dos substratos imiscíveis em água, tornando-os rapidamente disponíveis para o metabolismo microbiano (FRANCY *et al.*, 1991). Outra função destes agentes é o efeito antibiótico sobre vários microrganismos que competem por alimento (FIECHTER, 1992). Os microrganismos podem ainda utilizar biosurfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aumentar ou diminuir sua adesão. Esta estratégia é

utilizada de acordo com a necessidade de obtenção de novos *habitats* com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG; RON, 1999).

Os biosurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química e origem (Tabela 3). As principais classes incluem uma grande variedade de estruturas químicas, como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos de polissacarídeos ou proteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (LANG, 2002).

TABELA 3. PRINCIPAIS CLASSES DE BIOSURFACTANTES E MICRORGANISMOS PRODUTORES.

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICRORGANISMO
<b>Glicolipídeos</b>	
- ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> ; <i>Torulopsis apícola</i>
- trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<b>Lipopeptídeos e lipoproteínas</b>	
- surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bacillus pumilus</i>
- liquenissina	<i>Bacillus licheniformis</i>
- iturina	<i>Bacillus subtilis</i>
- fengicina	<i>Bacillus subtilis</i>
- polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
- gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
- peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
- kurstakina	<i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>
<b>Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos</b>	
- ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>

FONTE: Adaptada de NITSCHKE e PASTORE (2002).

Os biosurfactantes possuem uma estrutura comum: sua porção hidrofóbica é usualmente composta por uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos,

que podem ser saturados ou insaturados de cadeia linear ( $n$ ), hidroxilados ou ramificados (*iso*, um grupo metila no penúltimo carbono ou *anteiso*, um grupo metila no antepenúltimo carbono). Esta porção hidrofóbica está ligada a porção hidrofílica, que pode ser um carboidrato, aminoácido, um grupo peptídico cíclico, fosfato, carboxilato ou álcool (MULLIGAN, 2005). Desta forma, cada família de biosurfactante pode apresentar propriedades e funções fisiológicas diferentes (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; SÁNCHEZ *et al.*, 2006). A Figura 3 traz a estrutura química de alguns dos principais biosurfactantes.

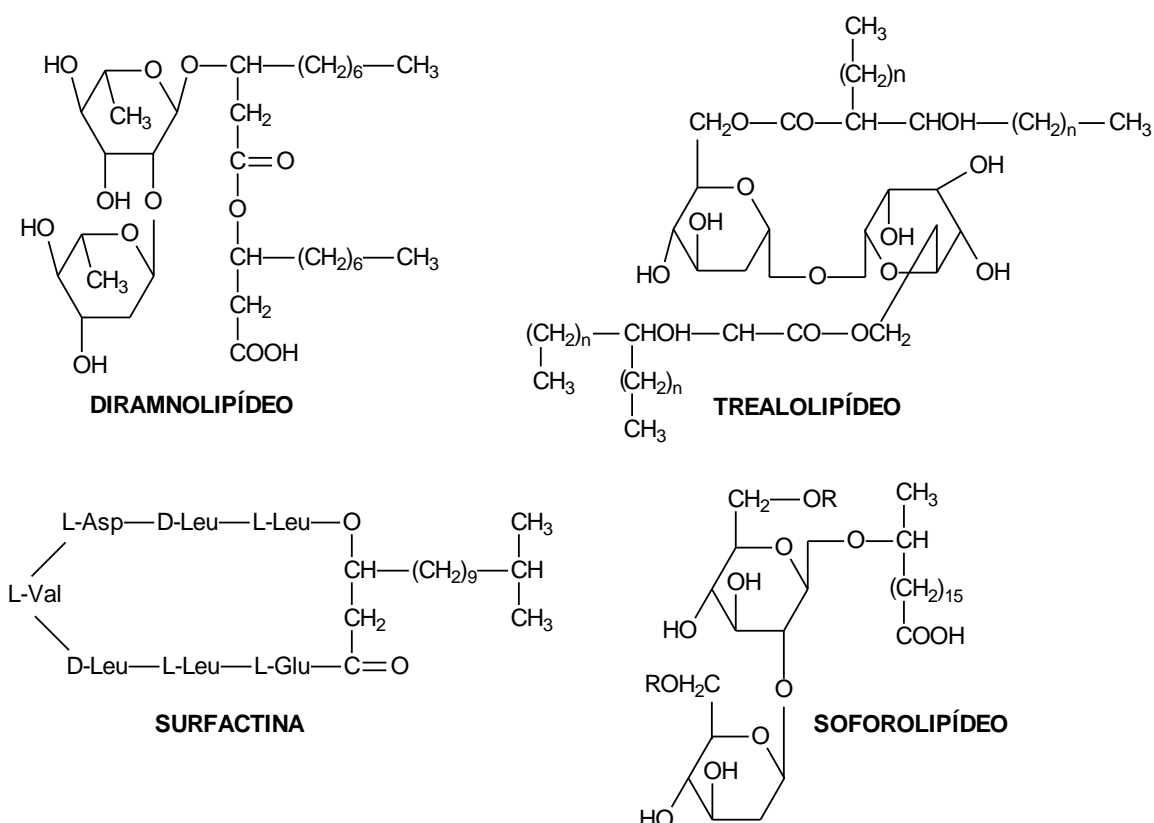


FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS DOS PRINCIPAIS BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS.

FONTE: Adaptado de CAMEOTRA e MAKKAR (1998).

Os biosurfactantes oferecem vantagens em relação aos surfactantes de origem química tais como: (1) possuem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (RAHMAN *et al.*, 2002; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; COSTA *et al.*, 2006); (2) são efetivos em ampla faixa de temperatura e pH (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MULLIGAN, 2005); (3) podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (BENINCASA *et al.*, 2002; NITSCHKE *et al.*, 2005) e (4) normalmente apresentam valores de concentração micelar crítica (CMC) menores que seus congêneres químicos (BANAT, 1995).

O interesse por biosurfactantes está baseado na gama de propriedades funcionais e diversidade estrutural que estes compostos possuem. Sugere-se aplicação nos mesmos setores industriais onde já são empregados os surfactantes químicos convencionais, como já mencionado na seção 3.1 (p. 23) (LANG; WULLBRANDT, 1999; SOBERÓN-CHÁVEZ; LEPINE; DÉZIEL, 2005).

As próximas seções tratarão especificamente dos lipopeptídeos produzidos pelo gênero *Bacillus*, que, juntamente com os ramnolipídeos, correspondem aos biosurfactantes mais conhecidos.

### 3.2.1 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos estão entre os surfactantes mais eficientes (ZAJIC; SEFFENS, 1984) e também são os mais conhecidos devido a suas atividades antibióticas, sendo melhor caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus* spp. Os lipopeptídeos mais comuns são divididos em quatro famílias compostas por peptídeos ligados a ácidos graxos: surfactina, iturina, fengicina e kurstakina (JACQUES, 2011). A porção peptídica da molécula pode ser neutra ou aniônica e os aminoácidos estão freqüentemente dispostos em uma estrutura cíclica (HATHOUT *et al.*, 2000; MAIER, 2003).

As famílias dos lipopeptídeos subdividem-se em isoformas, que diferem na composição dos aminoácidos da parte peptídica. As isoformas podem ainda ser subdividas em séries homólogas, que variam no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica, (Tabela 4 e Figura 4) (DELEU *et al.*, 1999; VATER *et al.*, 2002; ONGENA *et al.*, 2007; ROMERO *et al.*, 2007; JACQUES, 2011).

A família das surfactinas compreende 7 isoformas: bamilocina A, esperina, liquenisina, pumilacidina e as surfactinas A, B e C. A molécula de surfactina é um lipopetídeo cuja porção lipídica é comumente composta por ácidos graxos, que podem variar de 12 a 16 átomos de carbono, sendo o ácido 3-hidróxi-13-metil-tetradecanóico seu principal componente (KAKINUMA *et al.*, 1969). A principal isoforma, surfactina A, possui em sua porção peptídica a seqüência de resíduos de aminoácidos N-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-C (Figura 5) (VATER *et al.*, 2002; LIU; YANG; MU, 2008). As isoformas da surfactina A, B e C variam na posição do sétimo aminoácido, entre Leu (surfactina A), Val (surfactina B) e Ile (surfactina C). As proporções das isoformas produzidas depende da linhagem e das

condições ambientais e nutricionais em que o biosurfactante foi produzido (VATER *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2007; LIU; YANG; MU, 2008).

Os compostos identificados como iturinas são lipo-heptapeptídeos, assim como a surfactina. A iturina apresenta 6 isoformas predominantes, as iturinas A e C (Figura 6), a micosubtilisina e as bacilomicinas D, F e L. A principal isoforma, a iturina A, apresenta os resíduos de aminoácidos distribuídos na sequência N-L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser-C e um ácido graxo  $\beta$ -amino como componente lipofílico, com cadeias carbônicas que podem variar de 13 a 17 átomos de carbono (VATER *et al.*, 2002; ONGENA *et al.*, 2007; ROMERO *et al.*, 2007).

Já a família das fengicinas, que compreende as isoformas da fengicina e plipastatina, é composta por um ácido graxo  $\beta$ -hidróxi ligado a uma porção peptídica de 10 aminoácidos incluindo 8 em ciclo. As fengicinas consistem de duas principais isoformas que diferem pela troca de um aminoácido. A fengicina A (Figura 7A) é composta por L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-*allo*-Thr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile, e na Fengicina B (Figura 7B), o resíduo de aminoácido D-Ala é substituído por D-Val. Em ambas as isoformas, há uma ligação lactona conectando D-Tyr e L-Ile (VANITTANAKOM *et al.*, 1986; VATER *et al.*, 2002; ONGENA *et al.*, 2007; ROMERO *et al.*, 2007). Duas diferenças foram inicialmente identificadas para fengicina e plipastatina, o Glu ao invés de Gln na posição 8 e as formas D e L da tirosina que estão na posição 9 e 3 para a fengicina e 3 e 9 para a plipastatina (Tabela 4) (SCHNEIDER *et al.*, 1999).

O uso de MALDI-MS (ionização/dessorção a laser assistido por matriz) para caracterizar e diferenciar esporos de diferentes espécies de *Bacillus* levou Hathout *et al.* (2000) a descobrirem uma nova família de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus thuringiensis*, subespécie *kurstaki*. Esse novo biosurfactante chamado de kurstakina é composto de um lipo-heptapeptídeo que apresenta a sequência de aminoácidos N-D-Thr-Gly-D-Ala-Ser-His-D-Gln-Gln-C e uma cadeia de  $\beta$ -hidroxi ácido graxo que pode ser *n* ou *iso*, podendo variar de 11 a 13 carbonos. Os isômeros D ou L dos resíduos de aminoácidos ainda não foram caracterizados, no entanto, a recente identificação dos genes envolvidos na biossíntese deste lipopeptídeo indica que os aminoácidos presentes nas posições de 1 a 6 poderiam estar na forma D (BUMPUS *et al.*, 2009). A representação da estrutura química deste composto ainda não foi proposta.

TABELA 4. SEQÜÊNCIA DE PEPTÍDEOS E CADEIA DE ÁCIDOS GRAXOS DAS DIFERENTES VARIANTES DE CADA FAMÍLIA DE LIPOPEPTÍDEO DE *Bacillus* spp.

NOME	ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PORÇÃO PEPTÍDICA	CADEIA DE ÁCIDO GRAXO	REFERÊNCIA
FAMÍLIA DAS FENGICINAS	Decapeptídeo com um anel lactona entre o grupo carboxi terminal da Ile <sub>10</sub> e o grupo OH da Tyr <sub>3</sub>	β-OH ácidos graxos	
Fengicina A	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile	aC <sub>15</sub> , iC <sub>16</sub> , nC <sub>16</sub>	Schneider <i>et al.</i> (1999)
Fengicina B	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile	aC <sub>15</sub> , iC <sub>16</sub> , nC <sub>16</sub> , C <sub>17</sub>	Schneider <i>et al.</i> (1999)
PlipastatinaA	L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Glu-D-Tyr-L-Ile	nC <sub>16</sub> , aC <sub>17</sub>	Nishikiori <i>et al.</i> (1986)
Plipastatina B	L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Glu-D-Tyr-L-Ile	nC <sub>16</sub> , aC <sub>17</sub>	Nishikiori <i>et al.</i> (1986)
FAMÍLIA DAS ITURINAS	Heptapeptídeo fechado em um anel lactona com um grupo β-NH <sub>2</sub> da cadeia ácida	β-NH <sub>2</sub> ácidos graxos	
Bacillomicina D	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Pro-L-Glu-D-Ser-L-Thr	nC <sub>14</sub> , iC <sub>15</sub> , aC <sub>15</sub>	Peypoux <i>et al.</i> (1981)
Bacillomicina F	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Thr	nC <sub>16</sub> , iC <sub>17</sub> , aC <sub>17</sub>	Peypoux <i>et al.</i> (1985)
Bacillomicina L ou Lc <sup>a</sup>	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Glu-D-Ser-L-Thr	nC <sub>14</sub> , iC <sub>15</sub> , aC <sub>15</sub>	Volpon <i>et al.</i> (2007)
Iturina A	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC <sub>14</sub> , iC <sub>15</sub> , aC <sub>15</sub>	Peypoux (1978)
Iturina A <sub>L</sub>	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC <sub>16</sub> , aC <sub>16</sub>	Winkelmann <i>et al.</i> (1983)
Iturina C	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC <sub>14</sub> , iC <sub>15</sub> , aC <sub>15</sub>	Peypoux <i>et al.</i> (1986)
Micosubtilisina	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Ser-L-Asn	nC <sub>16</sub> , iC <sub>16</sub> , aC <sub>17</sub>	Peypoux <i>et al.</i> (1986)
FAMÍLIA DA KURSTAKINA	Heptapeptídeo com um anel lactona entre o grupo carboxila terminal da Gln <sub>7</sub> e o grupo OH da Ser <sub>4</sub>	cadeia de β-OH ácidos graxos	
Kurstakina <sup>b</sup>	D-Thr-Gly-D-Ala-Ser-His-D-Gln-Gln	iC <sub>11</sub> , nC <sub>12</sub> , iC <sub>12</sub> , iC <sub>13</sub>	Hathout <i>et al.</i> (2000)
FAMÍLIA DAS SURFACTINAS	Heptapeptídeo fechado em um anel lactona com o grupo β-OH da cadeia de ácido graxo	β-OH ácidos graxos	
Bamilocina A <sup>c</sup>	Glu-Leu-Met-Leu-Pro-Leu-Leu-Leu	C <sub>13</sub>	Lee <i>et al.</i> (2007)
Esperina <sup>d</sup>	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-XE <sub>7</sub> -COOH	C <sub>13</sub> , C <sub>14</sub> , C <sub>15</sub>	Thomas e Ito (1969)
Lichenisina <sup>e</sup>	L-XL <sub>1</sub> -L-XL <sub>2</sub> -D-Leu-L-XL <sub>4</sub> -L-Asp-D-Leu-L-XL <sub>7</sub>	iC <sub>13</sub> , aC <sub>13</sub> , nC <sub>14</sub> , iC <sub>15</sub> , aC <sub>15</sub>	Lin <i>et al.</i> (1994)
Pumilacidina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-XP <sub>7</sub>	aC <sub>15</sub> , iC <sub>15</sub> , nC <sub>16</sub> , iC <sub>16</sub> , aC <sub>17</sub> , iC <sub>17</sub>	Naruse <i>et al.</i> (1990)
Surfactina	L-Glu-L-XS <sub>2</sub> -D-Leu-L-XS <sub>4</sub> -L-Asp-D-Leu-L-XS <sub>7</sub>	iC <sub>14</sub> , nC <sub>14</sub> , iC <sub>15</sub> , aC <sub>15</sub>	Peypoux <i>et al.</i> (1999)

<sup>a</sup> ou bacilopectina<sup>b</sup> as formas D dos resíduos de aminoácidos são deduzidas pela estrutura modular de peptídeo sintases não ribossomais (BUMPUS *et al.*, 2009)<sup>c</sup> as formas D e L não são especificadas<sup>d</sup> a β-carboxila do Asp<sub>5</sub> faz parte da composição da lactona<sup>e</sup> ou halobacilina. Com XE<sub>7</sub> = Leu ou Val, XL<sub>1</sub> = Gln ou Glu, XL<sub>2</sub> = Leu ou Ile, XL<sub>4</sub> e XL<sub>7</sub> = Val ou Ile, XP<sub>7</sub> = Val ou Ile, XS<sub>2</sub> = Val, Leu ou Ile, XS<sub>4</sub> = Ala, Val, Leu ou Ile, XS<sub>7</sub> = Val, Leu ou Ile

FONTE: JACQUES (2011).



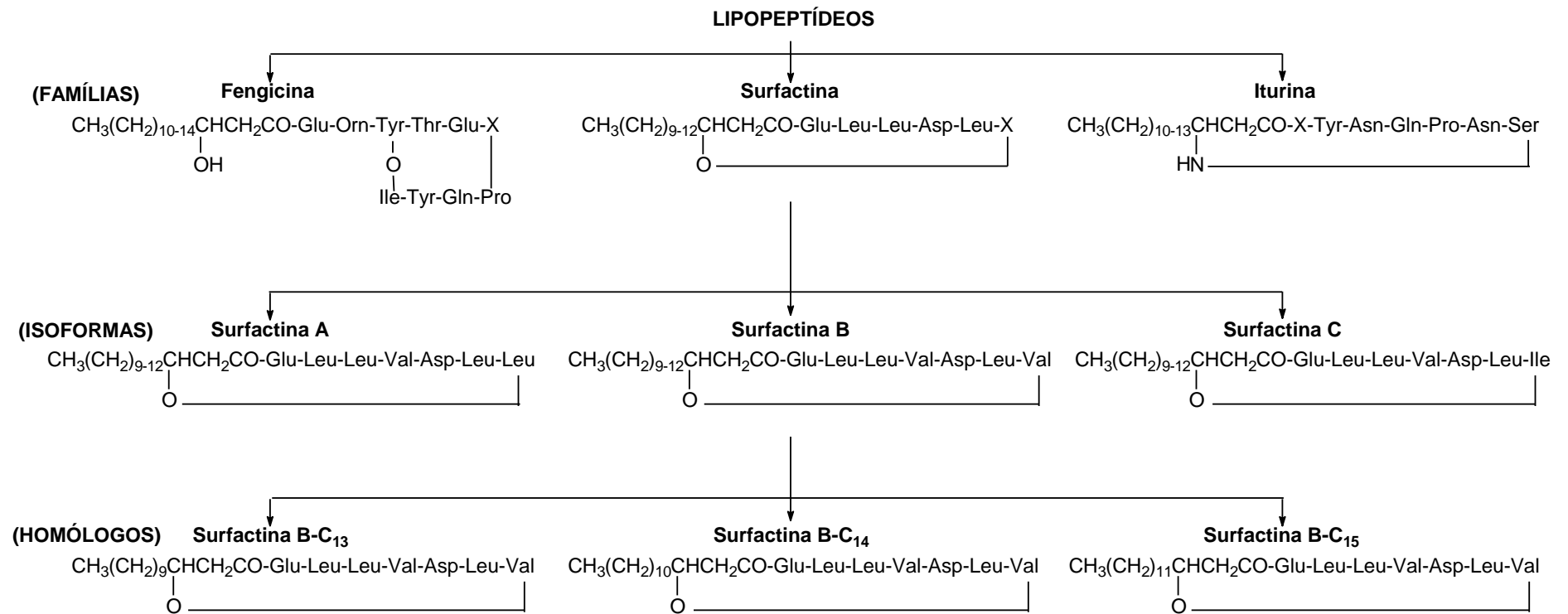


FIGURA 4. SUBDIVISÕES DOS LIPOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis*.  
FONTE: A AUTORA

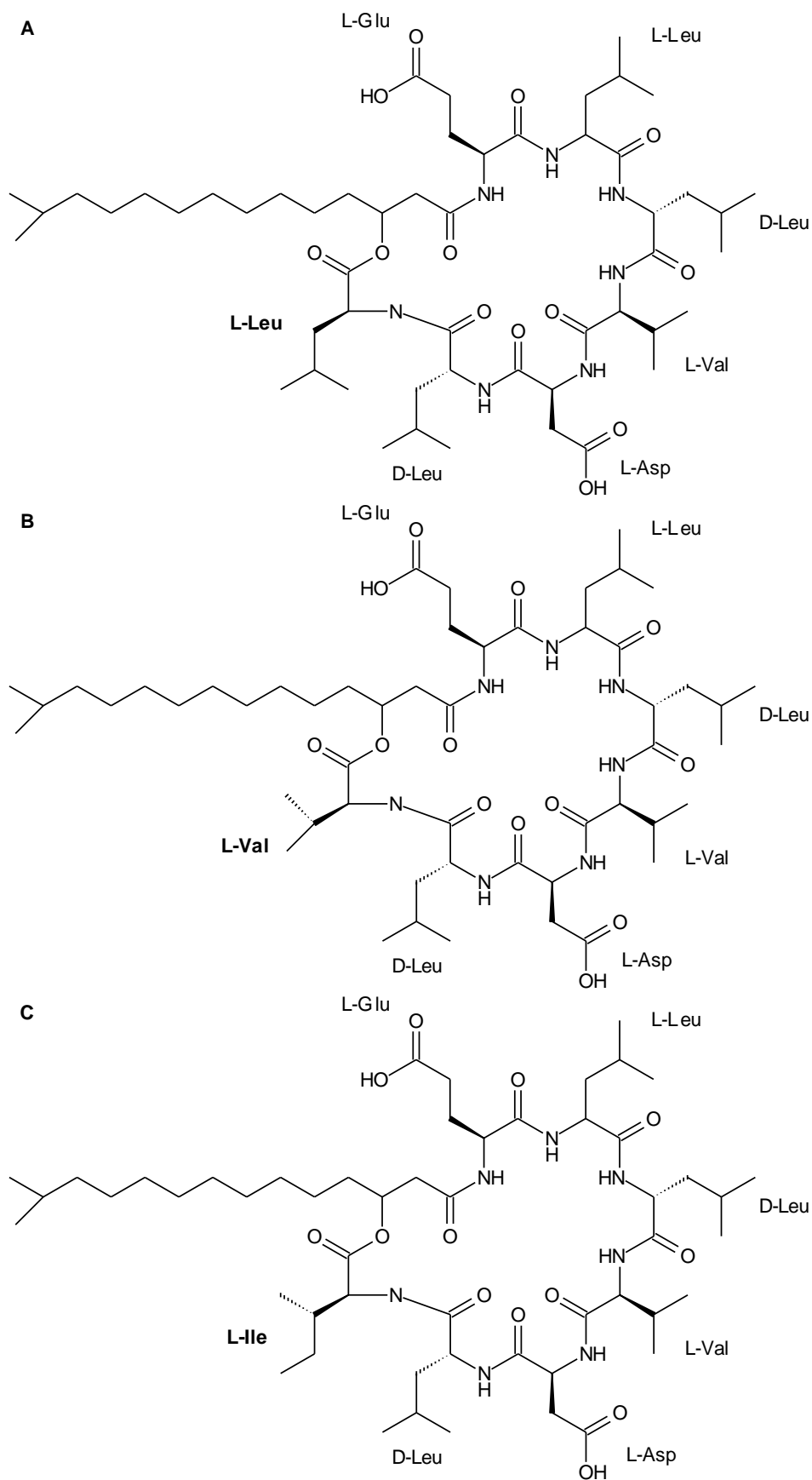


FIGURA 5. ESTRUTURA DO PRINCIPAL HOMÓLOGO (*iso*-C<sub>15</sub>) DA SURFACTINA. ISOFORMAS: **A)** SURFACTINA A, **B)** SURFACTINA B E **C)** SURFACTINA C. FONTE: VATER *et al.* (2002).

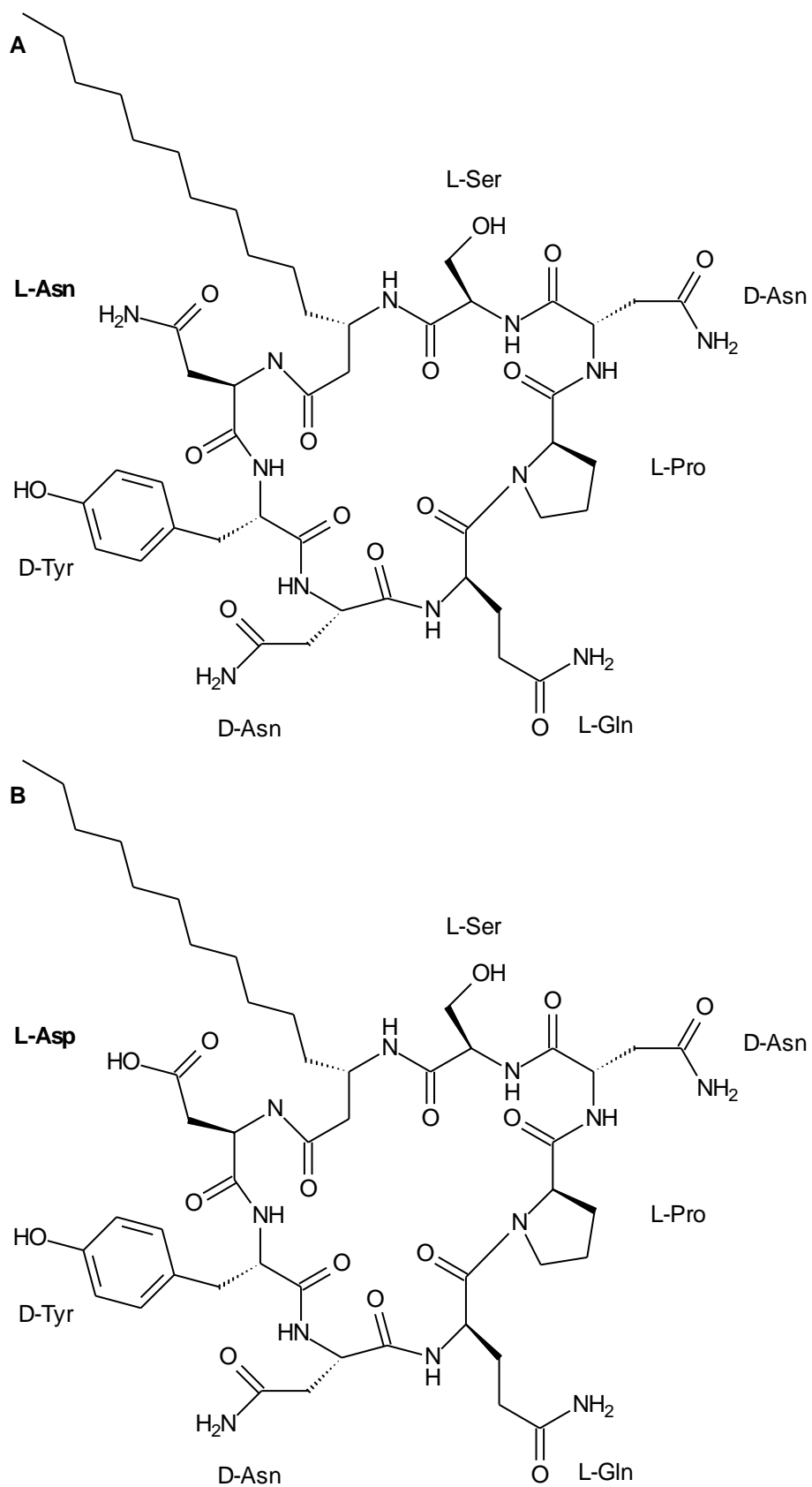


FIGURA 6. ESTRUTURA DO PRINCIPAL HOMÓLOGO ( $n$ -C<sub>14</sub>) DA ITURINA. Isoformas: **A**) Iturina A e **B**) Iturina C.

FONTE: VATER *et al.* (2002).

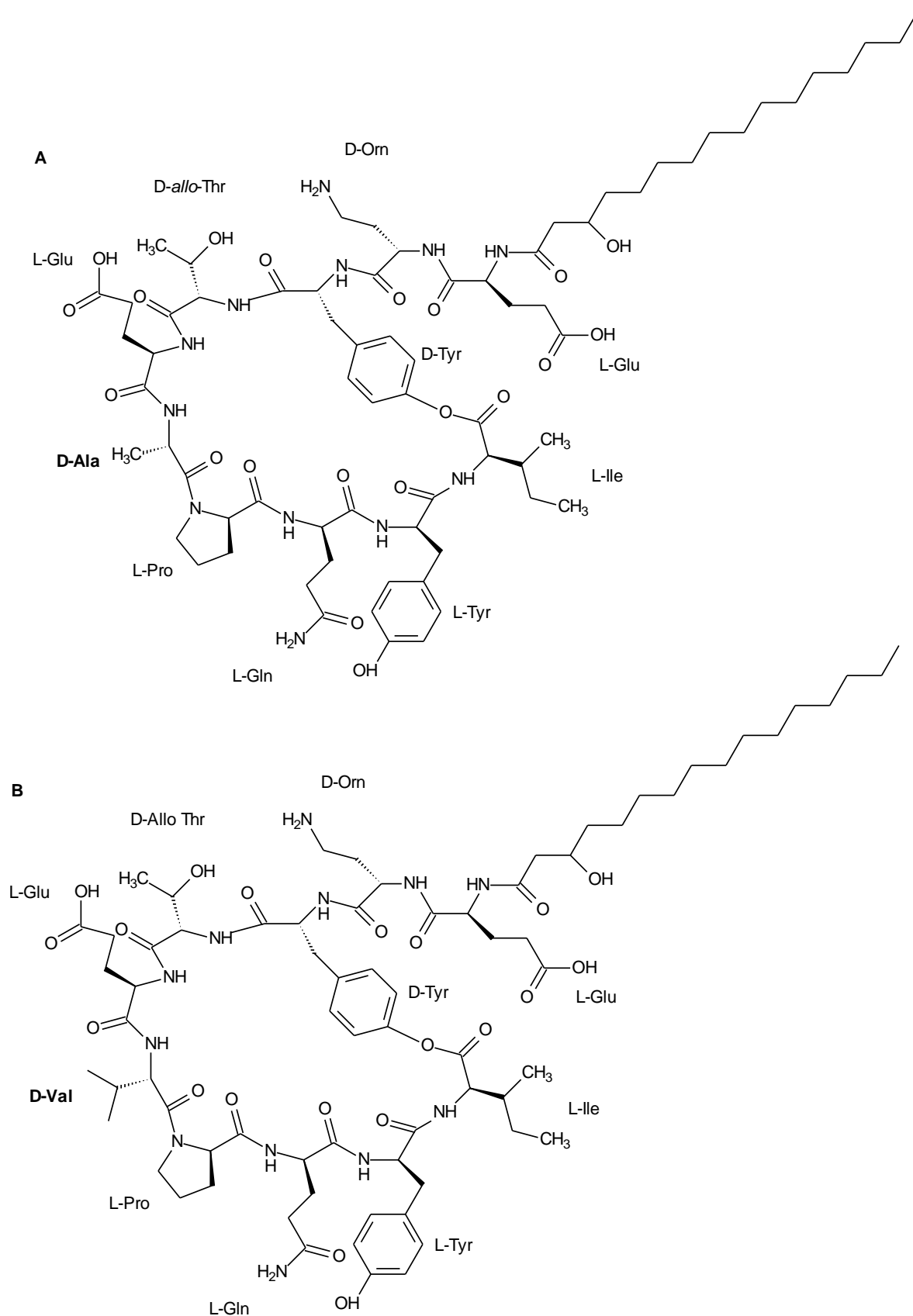


FIGURA 7. ESTRUTURA DO HOMÓLOGO  $n$ -C<sub>16</sub> DA FENGICINA. Isoformas: **A**) Fengicina A e **B**) Fengicina B.  
 FONTE: VATER *et al.* (2002).

### 3.2.1.1 Lipopeptídeos de *Bacillus pumilus*

Embora o gênero *Bacillus* geralmente seja conhecido como o principal produtor de lipopeptídeos, a maior parte dos estudos tem sido realizada utilizando apenas linhagens de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) e, por consequência, pouco foi investigado a respeito da produção de biosurfactantes por linhagens de *B. pumilus*. Os primeiros relatos são de Naruse *et al.* (1990) que produziram o lipopeptídeo pumilacidina (análogo à surfactina). Este composto, que apresenta atividade inibitória contra o vírus de herpes simplex, trata-se de um acil-heptapeptídeo cíclico composto de um  $\beta$ -hidroxi ácido graxo, dois resíduos de L-leucina, dois resíduos de D-leucina, um resíduo de ácido L-glutâmico e um resíduo de ácido L-aspártico (ou L-valina). Em 1992, Morakawa descreveu a síntese de surfactina A de *B. pumilus* A-1 isolado do solo (MORIKAWA; ITO; IMANAKA, 1992). Nestes experimentos, os autores investigaram a sequência de nucleotídeos dos genes responsáveis pela regulação da síntese da surfactina A. Cepas de *B. pumilus* 28-11 quando cultivadas na presença de petróleo e naftaleno sob condições aeróbicas foram capazes de sintetizar compostos com propriedades surfactantes, facilitando a obtenção de hidrocarbonetos utilizados como fonte de carbono e energia (CALVO; TOLEDO; GONZALEZ-LOPES, 2004). Propriedades antibióticas foram observadas para lipopeptídeos produzidos por *B. pumilus* HY1 isolado de milho de soja. A iturina A produzida por este microrganismo, bem como suas isoformas, apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* KCTC6905 (CHO *et al.*, 2009). Recentemente, Zhuravleva *et al.* (2010) utilizando a cepa de *B. pumilus* KMM456 identificaram a produção de 9 homólogos de surfactina: surfactina A (*anteiso*-C<sub>13</sub>, *n*-C<sub>13</sub>, *iso*-C<sub>14</sub>, *n*-C<sub>14</sub>, *anteiso*-C<sub>15</sub>), surfactina A metil éster (*n*-C<sub>14</sub>, *anteiso* C<sub>15</sub>), surfactina B (*anteiso* C<sub>15</sub>) e surfactina C (*anteiso* C<sub>15</sub>).

Alguns estudos utilizando a cepa de *B. pumilus* UFPEDA 448 também foram realizados pelo Grupo de Produção e Caracterização de Biosurfactantes Produzidos por Cepas Microbianas Nativas da UFPR, coordenado pelos professores David Alexander Mitchell e Nadia Krieger. Em um destes trabalhos Bugay (2009) cultivou o *B. pumilus* em FES em meio contendo okara (resíduo sólido da extração do leite de soja) e também uma mistura de okara com espuma de poliuretano, observando a produção de lipopeptídeos. As análises estruturais, realizadas por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) e cromatografia gasosa acoplada à

espectrometria de massa (CG-EM), demonstraram que o biosurfactante produzido trata-se de um lipopeptídeo composto por uma única isoforma, correspondente à surfactina A, com sete aminoácidos ligados em ciclo na ordem Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu, e por cinco homólogos, com variação da cadeia do ácido graxo de 12 a 16 átomos de carbono, sendo os homólogos C<sub>14</sub> e C<sub>15</sub> os mais abundantes. Cultivos realizados em FS, FES e os diferentes substratos utilizados nestes cultivos levaram à modificação da abundância relativa de cada homólogo.

### 3.2.2 Surfactina

#### 3.2.2.1 Propriedades físico-químicas de surfactina

As surfactinas apresentam excelentes características interfaciais, em concentrações inferiores a 20 µM conseguem reduzir a tensão superficial da água a 20 °C de 72 para 27 mN.m<sup>-1</sup> (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968; COOPER *et al.*, 1981; BOGNOLO, 1999; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999; LANG, 2002), e reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN.m<sup>-1</sup> (COOPER *et al.*, 1981; LANG, 2002). Os valores relatados para a concentração micelar crítica (CMC) das surfactinas encontram-se em torno de 10-11 mg.L<sup>-1</sup> (DELEU *et al.*, 1999; NITSCHKE *et al.*, 2004; BARROS; PONEZI; PASTORE, 2008). Quando são comparadas a outros biosurfactantes (COOPER *et al.*, 1981; HAFERBURG *et al.*, 2003) e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecil sulfato de sódio (SDS) (CMC de 2,5 g.L<sup>-1</sup>) e brometo de dodecil trimetil amônio (DTAB) (CMC de 4,6 g.L<sup>-1</sup>) (KIM *et al.*, 1997), apresentam maior eficiência. Devido ao fato de possuírem menor valor de CMC, o uso de uma concentração reduzida (mg.L<sup>-1</sup>) de surfactina é suficiente para atingir os mesmos efeitos de redução da tensão superficial e interfacial que seus congêneres químicos (COOPER *et al.*, 1981; KIM *et al.*, 1997; HAFERBURG *et al.*, 2003).

Vários experimentos têm demonstrado que as surfactinas são bastante estáveis quando submetidas a diversas condições. Os biosurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. quando submetidos a concentrações de NaCl de 2 a 3%, mantêm suas propriedades tensoativas inalteradas. A mesma concentração salina é suficiente para afetar as moléculas de surfactantes convencionais que perdem sua capacidade de redução da tensão superficial (LIN *et al.*, 1990). Biosurfactantes

produzidos por diferentes linhagens da cepa de *B. subtilis* C9 apresentaram amplo limite de estabilidade e manutenção de propriedades emulsificantes a limites variados de temperaturas (20-100 °C por 2 h, 121 °C por 30 min e 135 °C por 1 h), pH (5,0 a 12,0) e concentrações salinas de 15% (m/V) de NaCl e 10 mM de CaCl<sub>2</sub> (KIM *et al.*, 1997; COSTA, 2005).

A presença de enzimas proteolíticas (bromelina, ficina, papaína e tripsina) em contato com surfactinas não afetou a porção peptídica das moléculas, mantendo-se seu poder de redução da tensão superficial. Os biosurfactantes produzidos ainda apresentaram capacidade de formar emulsões estáveis em diversos óleos vegetais e hidrocarbonetos (KIM *et al.*, 1997; COSTA, 2005).

A acidificação de uma solução contendo surfactina para pH igual a 2 eleva a tensão superficial para 62 mN.m<sup>-1</sup>, que volta para 27 mN.m<sup>-1</sup> com a neutralização, mostrando a dependência das propriedades surfactantes da surfactina ao pH (COOPER *et al.*, 1981). Isto se deve ao fato de que em meio ácido a surfactina precipita devido a perda de solubilidade causada por protonação. Quando o pH do meio retorna ao valor original, o surfactante sofre desprotonação tornando-se novamente solúvel (COOPER *et al.*, 1981; COSTA, 2005).

### 3.2.2.2 Biossíntese de surfactina

A biossíntese de muitos lipopeptídeos e outros metabólitos secundários é conduzida por complexos multienzimáticos, os chamados sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPS) (MOOTZ *et al.*, 2002), que ligam os aminoácidos por ligações peptídicas (VATER *et al.*, 1997). Uma aciltransferase também é necessária na etapa inicial para transferir o hidróxi ácido graxo ao primeiro aminoácido do peptídeo (MENKHAUS *et al.*, 1993).

A via biossintética da surfactina é codificada por quatro genes localizados no operon *srfA* de 27 kb, três deles codificam as sintetases de peptídeos não ribossomais SrfAA, SrfAB e SrfAC, enquanto o gene terminal *srfD* codifica uma tioesterase do tipo II modificada, provavelmente envolvida no sistema de reparo dos aminoácidos adicionados ao peptídeo (SCHWARZER *et al.*, 2002; YEH *et al.*, 2004). O operon *sfp*, localizado a vários kilobases *downstream* de *srfA*, também é necessário para a produção de surfactante. Sfp é uma fosfopanteteinil transferase necessária para ativar a surfactina sintetase por modificação pós-translacional

Devido ao seu agrupamento único, o operon *srf* é regulado por um mecanismo envolvido no desenvolvimento da competência, um estado no qual a célula é hábil em capturar aleatoriamente DNA do ambiente (Figura 8) (SOLOMON; GROSSMAN, 1996).

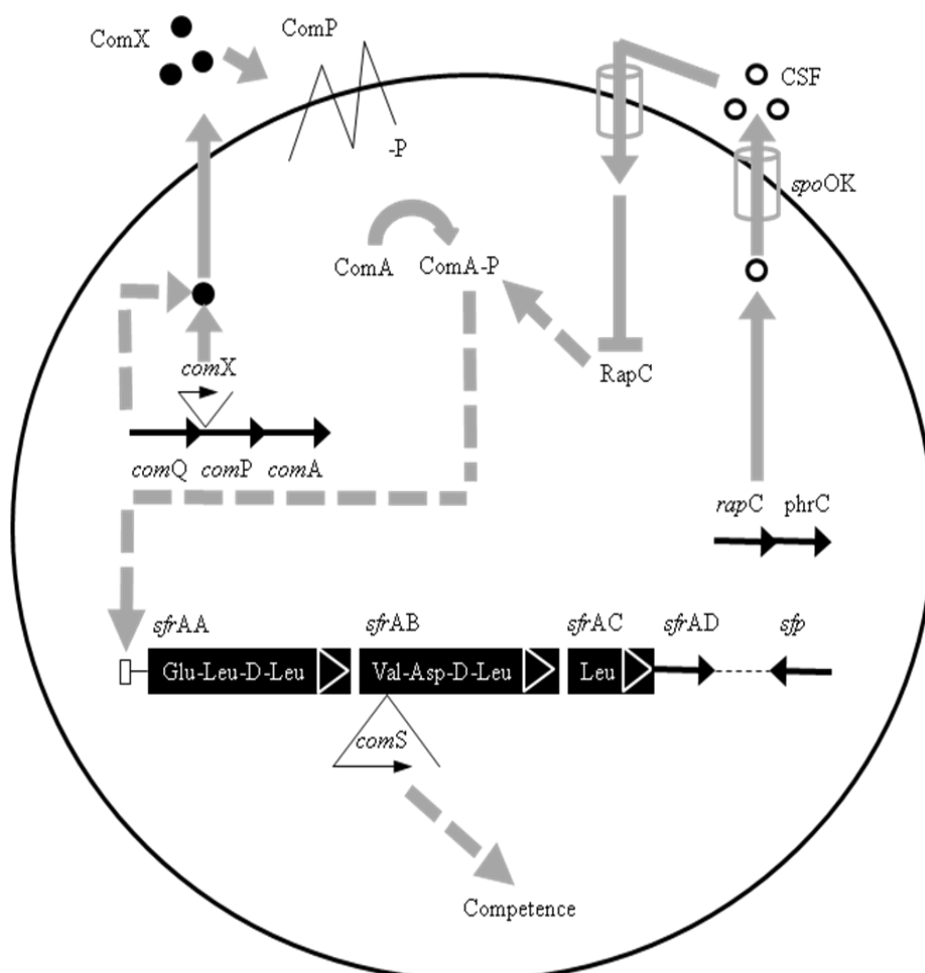


Figura 8. MODELO DE REGULAÇÃO PARA EXPRESSÃO DOS GENES DAS ENZIMAS DE SÍNTESE DA SURFACTINA. A regulação inicia com a transcrição de *comX* a qual é modificada pelo produto do gene *comQ*, tornando-se o peptídeo sinal ComX. ComX interage com uma histidina quinase, ComP, ligada a membrana, esta enzima sofre autofosforilação e então transfere o grupo fosfato a ComA. ComA fosforilada se liga ao operon *srfAA-AD* iniciando a transcrição da surfactina peptídeo sintetase, e também liga-se a *comS*, necessário para o desenvolvimento da competência. A região de ligação dos aminoácidos dentro de *srfAA-AD* estão apresentados em caixas representando estes três genes. O gene *downstream sfp* é também necessário para a produção de surfactina. Um segundo sistema *quorum sensing* é codificado por *phrC* e produz o fator de estimulação da competência (CSF). CSF depende dos produtos do gene *spoOK* para passar através da membrana celular. Em baixas concentrações, CSF estimula a expressão do operon *srfA* pela atividade de fosfotransferase de RapC.

Fonte: SULLIVAN, 1998.

Durante a síntese da surfactina, o *quorum sensing* controla a expressão de *srfA* através de um peptídeo sinal, ComX, que acumula no meio quando a densidade celular está alta (MAGNUSON *et al.*, 1994). ComX interage com a membrana celular



através de um sistema de transdução de sinal de dois componentes, que consiste de uma histidina quinase ligada a membrana, ComP, e o regulador de resposta, ComA. Quando fosforilada por ComP, ComA liga o promotor de *srfA* como um tetrâmero e inicia a transcrição (SOLOMON *et al.*, 1996). Um segundo sistema *quorum sensing* é codificado por *phrC* e produz um peptídeo sinal, fator estimulante da competência (CSF) e também influencia a expressão de *srfA* (NAKANO; ZUBER, 1993). CSF é transportado pela membrana por uma oligopeptídeo permease sendo dependente dos produtos do gene *spoOK*. Em baixas concentrações, CSF estimula a expressão de *srfA* através do controle do nível de fosforilação de ComA, provavelmente pela inibição da atividade de uma fosfatase codificada por *rapC*. Em altas concentrações, CSF inibe a expressão de *srfA* e estimula a esporulação, por um mecanismo RapC-independente (LAZAZZERA *et al.*, 1997).

Após a expressão dos genes *sfr*, a biossíntese da surfactina A inicia com a acilação do primeiro aminoácido, glutamato (Figura 9B), efetuada no módulo 1 da enzima SrfAA (região da enzima que liga um aminoácido específico). Os dois próximos resíduos, ambos sendo leucina são ligados ao lipopeptídeo em formação pelo segundo e pelo terceiro módulo da SrfAA sintetase. Pelo domínio de epimerização C-terminal do terceiro módulo, a segunda L-leucina é convertida ao isômero D. A enzima SfrAB é responsável pela incorporação dos próximos três aminoácidos (Val-Asp-D-Leu) enquanto a enzima SrfAC é responsável pela ativação e incorporação do último resíduo de leucina e catalisa a liberação do produto por ciclização (Figuras 8A e 8B) (COSMINA *et al.*, 1993; TSENG *et al.*, 2002).

A porção lipídica da surfactina é sintetizada *de novo*, pelos mesmos caminhos biossintéticos utilizados para produzir ácidos graxos para a membrana celular de *B. subtilis* (MENKHAUS *et al.*, 1993). Na síntese inicial da surfactina, a porção de ácido graxo necessita ser quimicamente ativada pela coenzima A (CoA) antes de sua incorporação à porção peptídica (MENKHAUS *et al.*, 1993; STELLER *et al.*, 2004). De acordo com Kaneda (1977), ácidos graxos saturados de cadeias ramificadas *iso* e *anteiso* são os componentes majoritários de lipídeos de membrana em *B. subtilis* (60-90% do total de ácidos graxos), sendo o ácido 13-metiltetradecanóico (*iso*-C15) o mais abundante, justificando o fato do homólogo majoritário da surfactina conter este composto.

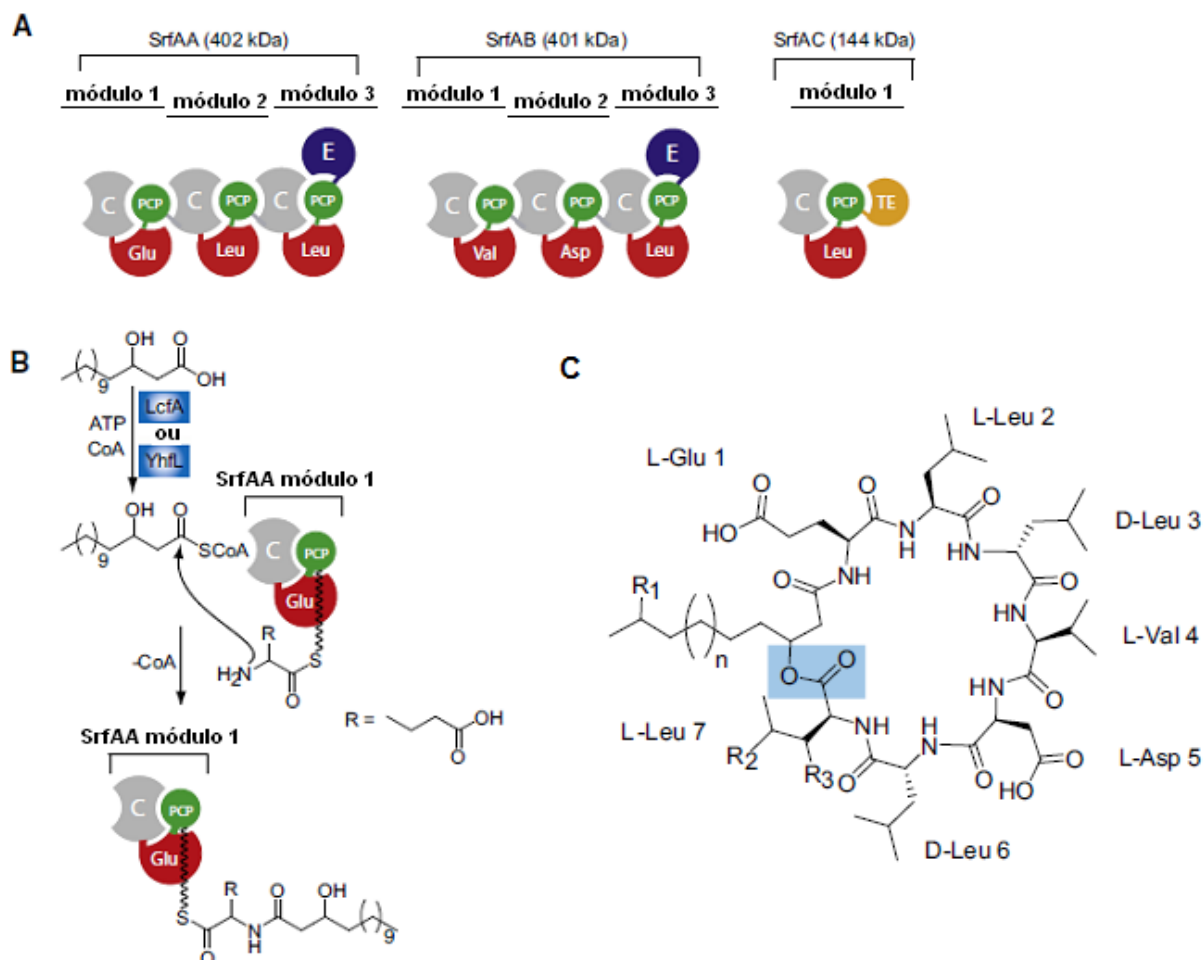


FIGURA 9. BIOSÍNTESE DA SURFACTINA. **A)** Representação esquemática para o complexo enzimático da biossíntese da surfactina, com o domínio de condensação colorido em cinza, domínio para a ligação de aminoácidos colorido em vermelho e proteínas carreadoras de peptidil em verde. Os domínios de epimerização estão apresentados em azul e o domínio tioesterase em laranja. **B)** Reação de acilação proposta durante a biossíntese da surfactina. O ácido graxo é ativado pela LcfA ou YhfL e então reconhecido pelo sítio doador do domínio C, catalisando o ataque do grupo amino do glutamato ligado ao PCP ao sítio aceptor. **C)** Estrutura da surfactina, ligação lactona colorida em azul. FONTE: Adaptada de KRAAS *et al.* (2010).

### 3.2.2.3 Aplicações de surfactina

A surfactina A foi primeiramente estudada por seu potencial para aplicações farmacêuticas. Além das atividades antifúngicas e antibacterianas a surfactina também tem sido relacionada a outras atividades biológicas, inibição da formação de coágulos de fibrina, indução da formação de canais iônicos em membranas de bicamada lipídica, inibição do desencadeamento da cascata do AMP cíclico, inibição da agregação plaquetária, inibição de fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica e do baço (PLA<sub>2</sub>) e atividade antiviral, antitumoral, anti-inflamatória e antimicoplasmática (KIM *et al.*, 1998).

Outras aplicações também são propostas para o uso da surfactina, sua capacidade de redução da tensão superficial e emulsificação permitiram sua aplicação na indústria de petróleo. A descoberta, no final da década de 90, de suas propriedades antivirais e antimicoplásmicas, levou à proposta de sua utilização em produtos farmacêuticos e biotecnológicos (VOLLENBROICH *et al.*, 1997). A presença de vários lipopeptídeos em diferentes alimentos fermentados asiáticos e africanos (N'DIR *et al.*, 1994; SUMI *et al.*, 2000) e também a secreção de surfactina por cepas isoladas destes produtos (CHO *et al.*, 2009) levaram ao estudo de sua aplicação no setor alimentar (NITSCHKE; COSTA, 2007). A capacidade da surfactina de induzir a resistência sistêmica em plantas e também induzir a colonização da rizosfera por rizobactérias promotoras de crescimento sugere sua aplicação em produtos fitofarmacêuticos (ONGENA; JACQUES, 2008). Muitos estudos também indicam sua eficiência em biorremediação e na indústria de petróleo (SEN 2008; WHANG *et al.*, 2008; MULLIGAN, 2009; CAMEOTRA; MAKKAR, 2010; JACQUES, 2011). A Figura 10 apresenta uma visão geral dos setores de aplicação da surfactina.

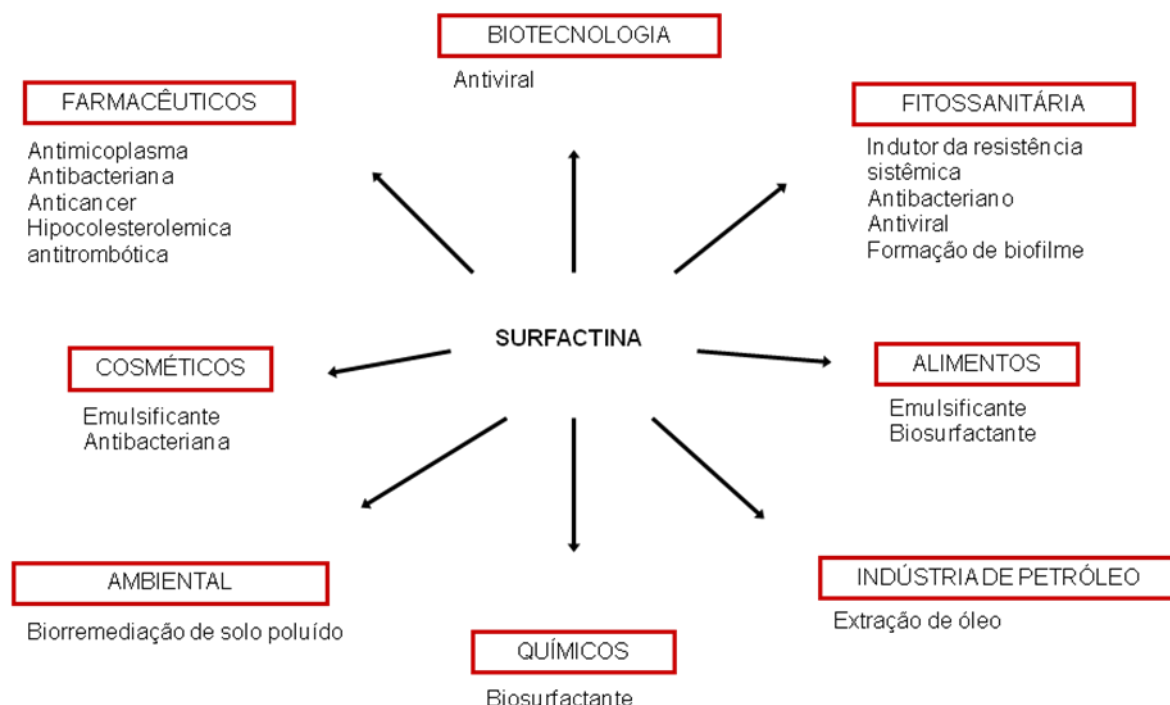


FIGURA 10. SETORES DE APLICAÇÃO E PROPRIEDADES EXPLORADAS DE SURFACTINA.  
FONTE: Adaptada de JACQUES (2011).

### 3.3 PRODUÇÃO DE SURFACTINA

Na literatura há relatos da produção de surfactina tanto por fermentação submersa (FS) quanto fermentação em estado sólido (FES). Nesta seção serão abordados estes métodos de cultivo utilizados. Inicialmente será feita uma abordagem geral das técnicas de cultivo em FS e FES com suas vantagens e desvantagens. Em seguida serão levantadas as principais estratégias de produção de surfactina em FS, sendo esta a tecnologia clássica utilizada. Posteriormente, serão apresentadas as estratégias utilizadas em FES para a produção de surfactina e iturina.

#### 3.3.1 Processos fermentativos

As técnicas biotecnológicas para produção de metabólitos a partir de microrganismos (entre os quais, os biosurfactantes) são basicamente FS e FES. Estas duas técnicas diferem, sobretudo, no teor de água contido nos meios de cultivo. Como uma regra aproximada, na FS a quantidade de sólido não ultrapassa  $50 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo que estes sólidos estão totalmente solúveis ou dispersos no líquido. Já a FES envolve o cultivo de microrganismos nas superfícies de partículas orgânicas úmidas, dentro de um leito em que há uma fase gasosa contínua nos poros entre as partículas sólidas. Os substratos sólidos apresentam limitação de água livre nos espaços intersticiais. Entretanto, o substrato deve ter umidade suficiente para comportar o crescimento e o metabolismo do microrganismo. A água necessária para o crescimento do microrganismo encontra-se absorvida dentro das partículas do substrato (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002a; MITCHELL *et al.* 2004; 2006).

Embora a FS apresente vantagens aparentes, pois é mais fácil obter o controle deste tipo de processo além da facilidade em recuperar o produto produzido, ao longo dos últimos anos a FES tem ganhado destaque. Isto é devido ao relativo baixo custo do processo, pois resíduos agroindustriais são comumente utilizados como substrato, e também pelo fato do processo ser conduzido em uma quantidade mínima de água líquida entre os poros das partículas do substrato, resultando em um baixo consumo de água e baixa produção de efluentes (PANDEY, 2003; HOLKER; LENZ, 2005). Processos de FES ainda apresentam outras

vantagens se comparadas à FS, pois podem utilizar uma ampla variedade de matrizes sólidas, além de apresentarem baixo gasto energético. Os processos de recuperação do produto em geral são mais rápidos e menos trabalhosos que em FS e ainda podem apresentar maior produtividade volumétrica, maior concentração dos produtos, maior reprodutibilidade. Além disso, podem ocorrer a síntese de enzimas e outros metabólitos que normalmente não seriam produzidos em FS (KRISHNA, 2005). Neste contexto, foram estabelecidos diversos processos industriais/comerciais utilizando a FES para a produção de compostos de valor agregado, tais como enzimas microbianas industrialmente importantes, bioinseticidas, metabólitos secundários e produtos farmacêuticos (DAS; MUKHERJEE, 2007).

Como na FS, a eficiência da FES depende dos parâmetros pH, temperatura, aeração, do tipo de substrato e do microrganismo. No entanto, além dos parâmetros supracitados, a umidade e a natureza do substrato sólido empregado são fatores críticos na viabilidade do processo, pois o aumento ou diminuição do conteúdo de água no meio sólido pode levar a alteração da atividade de água e afetar o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, a produção de metabólitos. Essa alteração na umidade também precisa ser controlada para evitar compactação do leito de fermentação, o que leva a redução de porosidade e restringe a difusão de gases entre as partículas do sólido. Por outro lado, os baixos níveis de umidade podem limitar o crescimento do microrganismo e também diminuir o seu acesso aos nutrientes (SINGHANIA *et al.*, 2009).

Outro fator chave e característico da FES é o substrato. Os substratos sólidos utilizados na FES podem servir como suporte e como fonte de nutrientes (rejeitos industriais) ou apenas suportes inertes (por exemplo, espuma de poliuretano) suplementados com meio rico em nutrientes (YANG *et al.*, 2005). A seleção dos substratos para o processo de FES depende de muitos fatores, entre eles está sua composição química. Durante o desenvolvimento do processo fermentativo, a composição do substrato não pode sofrer muita alteração, pois se o substrato for muito heterogêneo isto irá prejudicar a reprodutibilidade do processo (MITCHELL *et al.*, 2006).

Além da composição e da manutenção das características químicas, uma das mais importantes propriedades físicas do substrato para a eficiência do processo de FES é o tamanho de suas partículas. Partículas pequenas favorecem a

compactação do sólido e, conseqüentemente, impedem a difusão de gases e dificultam a passagem de ar. Contrariamente, partículas grandes favorecem maior aeração, mas limitam a superfície disponível para o crescimento do microrganismo. Portanto, o tamanho ideal da partícula deve representar um compromisso entre a acessibilidade dos nutrientes e a disponibilidade de oxigênio (PANDEY *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 2002b; 2006).

Cabe ressaltar que a importância do substrato não se restringe às suas propriedades físicas e químicas para a FES. A possibilidade do uso de resíduos agroindustriais como substrato nesse tipo de processo apresentam grande interesse econômico e ambiental (CASTILHO *et al.*, 2000; COUTO; SANROMÁN, 2006). Considerando que o Brasil é um país economicamente agrícola, o aproveitamento desses rejeitos torna-se de grande interesse, pois são matérias-primas abundantes, de baixo custo e quando não reaproveitadas tornam-se uma fonte de poluição ambiental (ROSA, 2004).

O uso de FES ainda apresenta outras vantagens em relação a FS, especialmente para a produção de biosurfactantes. Em FS os processos são conduzidos com aeração forçada. Assim, quando o biosurfactante começa a ser produzido, grandes quantidades de espuma são formadas, e há uma tendência das células do microrganismo produtor, nutrientes e produtos acumularem-se nesta espuma. Assim, se faz necessário a utilização de métodos de contenção de formação de espuma, pois esta prejudica intensamente o processo. Há uma tendência da espuma sair do reator e conseqüentemente carregar nutrientes, produtos e biomassa. A efetividade do sistema ou da estratégia de contenção é essencial para garantir a viabilidade do processo, uma vez que a intensa formação de espuma acarreta em perda de rendimento e produtividade, além de gerar dificuldades operacionais (LEE; KIM, 2004; YEH; WEI; CHANG, 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

#### 3.3.1.1 Produção de surfactina por fermentação submersa

Apesar de possuir muitas propriedades atraentes para comercialização e vantagens comparadas aos surfactantes sintéticos, há poucos processos de produção de biosurfactantes em uma escala comercial (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010), devido ao seu baixo rendimento, o que leva a altos custos

de produção. Salienta-se que os principais lipopeptídeos comercializados atualmente (surfactina e iturina) são produzidos por processos de fermentação submersa (FS) utilizando cepas de *B. subtilis*. A principal empresa de comercialização é a Sigma-Aldrich (St. Louis-USA), que oferece os produtos com um custo aproximado de US\$ 50 por miligrama para a surfactina e US\$ 310 por miligrama para a iturina, ambos comercializados na sua forma purificada.

Existem alguns estudos sobre a otimização dos meios líquidos e condições de cultura para obtenção de surfactina produzida por cepas do gênero *Bacillus* em FS. Os níveis de produção de surfactina nestes estudos foram na ordem de: 300 mg.L<sup>-1</sup> utilizando sacarose como fonte de carbono e adicionando ferro ao meio de cultivo (AL-AJILANI *et al.*, 2007); 1,1 g.L<sup>-1</sup> utilizando melaço como fonte de carbono em batelada em frascos Erlenmeyers (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWABA; HASSOUNA, 2008); 3,3 g.L<sup>-1</sup> quando foi estudado o efeito de elementos-traços no meio de cultivo em batelada em frascos Erlenmeyers, com a adição de 40 mmol.L<sup>-1</sup> de Mg<sup>2+</sup> e 10 mmol.L<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup> (WEI; LAI; CHANG, 2007); 3,5 g.L<sup>-1</sup> em meio salino enriquecido com 1,7 mM de ferro em batelada em Erlenmeyers (WEI; CHU, 1998); 3,6 mg.L<sup>-1</sup> com a adição de carvão ativo ou argila expandida que serviram como partículas porosas para condução de nutrientes no meio de cultivo (YEH; WEI; CHANG, 2005).

Como estratégia para melhorar o rendimento da surfactina em FS devido a formação de espuma, Yeh, Wei e Chang (2006) integraram ao fermentador convencional (frascos Erlenmeyers) um coletor de espuma, um reciclador celular e uma unidade de precipitação da surfactina. Carvão ativo também foi adicionado ao caldo de fermentação para aumentar a concentração de biomassa e a concentração de surfactina aumentou para 6,5 g.L<sup>-1</sup>. O biorreator proposto permitiu uma fermentação estável e eficiente sob condições intensas de formação de espuma, sem a necessidade da adição de agente anti-espumante.

### 3.3.1.2 Produção de surfactina por fermentação no estado sólido

Com relação à produção de lipopeptídeos por FES, a literatura demonstra um maior interesse por este tipo de processo a partir de 2006 (Tabela 5), sendo majoritariamente direcionada para a produção de iturina. Até o momento, de acordo com busca realizada neste trabalho, apenas Bugay (2009) e Ohno, Ano e Shoda

(1995a, 1995b) relatam o estudo da produção de surfactina. Bugay (2009) utilizou o resíduo sólido da extração do leite de soja (okara) e espuma de poliuretano para a produção de uma mistura de homólogos de surfactina A por *B. pumilus* em FES, obtendo 0,4 g.kg-SS<sup>-1</sup> (sólido seco) de surfactina. Ohno, Ano e Shoda (1995a, 1995b) estudaram a produção de surfactina utilizando okara como substrato para a FES. No primeiro trabalho os autores utilizaram a cepa de *B. subtilis* MI113 recombinante para a produção de surfactina, obtendo uma produção máxima de 10 g.kg-SS<sup>-1</sup>, sendo esta 4-5 vezes maior que a produção em FS. Já no segundo trabalho os autores avaliaram a influência da temperatura na produção de iturina A e surfactina em FES utilizando a cepa de *B. subtilis* RB14, onde foi obtida a produção máxima de iturina A (6 g.kg-SS<sup>-1</sup>) a 25 °C e de surfactina (2,5 g.kg-SS<sup>-1</sup>) a 37 °C.

TABELA 5. PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.

MICROORGANISMO	SUBSTRATO (quantidade utilizada)	LIPOPEPTÍDEO	REFERÊNCIA
<i>B. subtilis</i> MI113(pC112)	okara (15 g-SS)	surfactina	Ohno, Ano e Shoda (1995a)
<i>B. subtilis</i> RB14	okara (15 g-SS)	surfactina e iturina A	Ohno, Ano e Shoda (1995b)
<i>B. pumilus</i> UFPEDA 448	okara + espuma (10 g-SS)	surfactina A	Bugay (2009)
<i>B. subtilis</i> NB22	farelo de trigo (15 g-SS)	iturina A	Ohno, Ano e Shoda (1992)
<i>B. subtilis</i> NB22	okara (3 kg-SS)	iturina A	Ohno, Ano e Shoda (1993)
<i>B. subtilis</i> NB22	okara (15 g-SS)	iturina A	Ohno, Takashi e Shoda (1996)
<i>B. subtilis</i> RB14 CS	okara (15 g-SS)	iturina A	Mizumoto, Hirai e Shoda (2006)
<i>B. subtilis</i> RB14 CS	okara (15 g-SS)	iturina A	Mizumoto e Shoda (2007)
<i>B. subtilis</i> S3	farelo de trigo (10 g-SS) e farelo de arroz (50 g-SS)	iturina A	Shih <i>et al.</i> (2008)
<i>B. subtilis</i> RB14 CS	okara (2 kg-SUm)	iturina A	Ano <i>et al.</i> (2009)
<i>B. subtilis</i> B6-1	resíduo de soja e batata doce (20 g-SS)	fengicina	Wang <i>et al.</i> (2008)
<i>B. subtilis</i> FE-2	farelo de trigo (5 g-SS) ou (500 g-SS)	não identificado	Veenanadig, Gowthaman e Karanth. (2000)
<i>B. subtilis</i> DM-03 e DM-04	casca de batata (5 g-SS)	não identificado	Das e Mukherjee (2007)



O uso de FES para a produção de surfactina pode ser uma alternativa para a produção deste lipopeptídeo, pois evita o processo de formação de espuma e possibilita a utilização de resíduos agroindustriais que leva a diminuição dos custos do processo. Visto os bons resultados obtidos com a iturina em FES, pode-se esperar que novos estudos realizados com surfactina também possam apresentar resultados compatíveis, fazendo com que a FES seja uma alternativa para a produção de surfactina.

No entanto, a produção de biosurfactantes por FES apresenta suas próprias dificuldades. A produção em larga escala é dificultada pelos problemas relacionados com a transferência de calor e de massa em biorreatores (DURAND, 2003), uma vez que estes fenômenos são mais intensos em grandes biorreatores do que em escala de bancada. Para se obter processos de ótima eficiência em biorreatores de FES, há a necessidade de estratégias de ampliação de escala (*scale-up*) (MITCHELL; BEVORIC; KRIEGER, 2000; MITCHELL *et al.*, 2006). A obtenção das condições ótimas em escala laboratorial não é suficiente para estabelecer um processo industrial viável. Também há a necessidade de projetar, construir e operar biorreatores que possam fornecer as condições mais próximas possível às condições ótimas (MITCHELL *et al.*, 2006; KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

#### 3.3.1.2.1 Estudos de ampliação de escala para a produção de lipopeptídeos em fermentação em estado sólido

Algumas tentativas de aumento de escala, ainda em nível laboratorial, já foram realizadas para a produção de iturina por FES. O aumento da concentração de okara utilizado como substrato de 15 g para 3 kg em batelada em Erlenmeyers levou a uma diminuição da produção de iturina de  $1,65 \text{ g.kg-SUM}^{-1}$  (sólido úmido) para  $1,2 \text{ g.kg-SUM}^{-1}$ . Os autores consideram que a diminuição da produtividade no frasco de 3 kg poderia ser devido à temperatura mais elevada no centro do fermentador, que chegou a  $45^\circ\text{C}$ , bem distante dos  $25^\circ\text{C}$  que é considerada a temperatura ótima para este processo (OHNO; TAKASHI; SHODA, 1996). Em outro estudo, estes mesmos autores demonstraram que o uso de aeração forçada em biorreatores de 3 kg de leito foi eficaz na dissipação do calor e elevou os níveis de

produção de iturina de 3 g.kg-SS<sup>-1</sup> para aproximadamente 6 g.kg-SS<sup>-1</sup> (OHNO; ANO; SHODA, 1993).

Veeananadig, Gowthaman e Karanth (2000) utilizaram farelo de trigo como substrato para a produção de um biosurfactante não identificado, utilizando a cepa de *B. subtilis* FE-2 em estudos de aumento de escala em biorreator de colunas com aeração forçada de 20 L.min<sup>-1</sup> e comprovaram a melhora de produção neste sistema em comparação ao controle realizado em frascos Erlenmeyers. Nestes experimentos, a concentração do biosurfactante produzido não foi determinada diretamente, bem como a classe do surfactante também não foi identificada. Neste estudo a presença do biosurfactante foi identificada pela redução de tensão superficial de 54 mN.m<sup>-1</sup> para 24 mN.m<sup>-1</sup> quando o extrato de fermentação obtido das colunas foi adicionado a água e 35 mN.m<sup>-1</sup> com o extrato obtido dos frascos Erlenmeyers.

Mais recentemente, Ano *et al.* (2009) desenvolveram um reator com capacidade para 2 kg de leite para a produção de iturina A por *B. subtilis* RB14-CS, utilizando o okara como substrato. Este reator permite agitação do sistema, controle da temperatura e aeração forçada. Os experimentos que foram conduzidos sem agitação e aeração forçada não produziram iturina. Quando foi aplicado o uso de agitação de 25 rpm e aeração forçada de 10 L.min<sup>-1</sup> a produção de iturina foi obtida em níveis baixos, cerca de 0,5 g.kg-SUm<sup>-1</sup>. Níveis maiores de iturina foram obtidos nos experimentos conduzidos sem agitação, 2,7 g.kg-SUm<sup>-1</sup>, com aeração de 10 L.min<sup>-1</sup> e 4 g.kg-SUm<sup>-1</sup>, com aeração de 20 L.min<sup>-1</sup>. A baixa produção de iturina foi devida à mistura do substrato pelo movimento contínuo do reator, resultando em tamanhos de partículas menores que culminou com o fornecimento limitado de ar para o crescimento microbiano. Além disso, sem agitação, ocorreu aumento de temperatura no interior do leite, a qual foi dissipada por aumento na taxa de aeração, mantendo a temperatura entre 25-30 °C.

#### 3.3.1.2.2 Uso de okara na produção de lipopeptídeos

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito utilizados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Entre a gama de aplicações para o grão de soja, encontra-se a produção do leite de soja. Essa bebida é produzida pela trituração dos grãos secos de soja que são misturados com

a água. O líquido obtido consiste no leite de soja e o resíduo sólido que fica retido é chamado de “okara” (EMBRAPA, 2011).

O okara apresenta uma composição em massa seca de aproximadamente 25% de proteínas, 13% de carboidratos e 5% de lipídeos, sendo que a maior parte das proteínas presentes neste resíduo é insolúvel. Apesar da presença de componentes nutritivos e funcionais e seu potencial para a aplicação em produtos alimentícios, mais de 90% do okara é destinado a alimentação animal (O'TOOLE, 1999).

Muitos trabalhos relatados na literatura indicam a possibilidade de aplicação do okara para produção de lipopeptídeos por FES, como pode ser observado na Tabela 5 (p.46). Durante a realização do presente trabalho levantou-se a hipótese de que a grande eficácia do okara pode estar relacionada, principalmente, ao conteúdo de proteínas que servem como precursores de aminoácidos para a síntese da porção peptídica da molécula do lipopeptídeo, além dos carboidratos e lipídeos, servirem como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo.

A montagem da porção peptídica dos lipopeptídeos ocorre a partir das sintetases de peptídeos não ribossomais, e a presença de aminoácidos no meio de cultura pode influenciar o tipo e a quantidade de lipopeptídeos produzidos (DESAI; BANAT, 1997). Peypoux e Michel (1992) observaram em seus estudos que quando aminoácidos eram adicionados ao meio de cultivo de FS como única fonte de nitrogênio para a produção de surfactina, alguns aminoácidos hidrofóbicos foram inseridos diretamente em posições específicas da seqüência peptídica, amplificando a heterogeneidade estrutural do lipopeptídeo através da produção de variantes. Em outro estudo para a produção de surfactina em FS, Kluge *et al.* (1988) utilizaram um meio contendo aminoácidos ou seus precursores marcados com  $^{14}\text{C}$ , sendo observada sua incorporação direta no ácido graxo ou porção peptídica da surfactina produzida (KLUGE *et al.*, 1988). Besson e Michel (1992) mostraram que a presença de aminoácidos marcados com  $^{14}\text{C}$  no meio de cultivo parece estar ligada a ativação do complexo da lipopeptídeo sintetase (BESSON; MICHEL, 1992). Isto indica que um aumento na quantidade de aminoácidos disponíveis no meio de cultivo pode aumentar a produção do lipopeptídeo pelos microrganismos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em cinco etapas. Primeiramente foi realizado o isolamento e *screening* de cepas com potencial para produção de biosurfactantes. A partir da cepa selecionada, juntamente com a cepa de *B. pumilus* UFPEDA 448 que já estava sendo utilizada no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise para a produção de surfactina, foram testados os meios de cultivo para FES. A próxima etapa, realizada parte em frascos Erlenmeyers e parte em colunas de Raimbault, consistiu de experimentos de otimização das condições de FES. Em seguida, foi realizada a cinética de produção da surfactina em FES e a obtenção de dados de respirometria utilizando as colunas de Raimbault. Por fim, foi realizada a determinação das propriedades tensoativas da surfactina produzida em FES nas condições otimizadas.

### 4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTE

#### 4.1.1 Identificação dos locais de coleta

Considerando-se a necessidade de obtenção de novas cepas de microrganismos com potencial para a produção de biosurfactantes que sejam capazes de crescer em ambientes restritos em relação à temperatura, pressão e salinidade, amostras de água de produção de petróleo e solo em contato com esta água foram coletadas em uma estação da Petrobrás de extração de petróleo em solo, localizada no município de Carmópolis-SE, a 45 km da capital Aracaju. Os microrganismos foram coletados em dois pontos distintos.

No primeiro ponto, foram coletadas amostras de solo, que entra em contato com a água de produção do petróleo (ou “água produzida”) através de um vazamento da tubulação por onde passa esta água (Figura 11A). A água de produção do petróleo consiste normalmente da água que é injetada nas rochas para facilitar a extração do petróleo por diferença de pressão.

No segundo ponto, foi coletada apenas a água de produção do petróleo, diretamente da tubulação (Figura 11B), em um ponto anterior à adição de compostos químicos que são utilizados justamente para impedir o crescimento de

microrganismos que possam degradar o petróleo, comprometendo sua qualidade. Nestas tubulações existem pontos de coleta de amostras de água para análises físico-químicas.

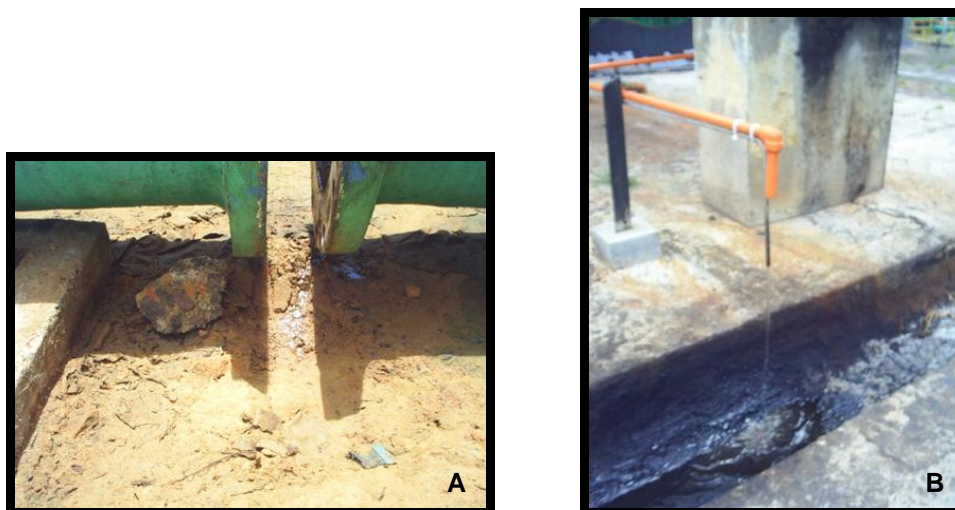


FIGURA 11. PONTO DE COLETA DE MICRORGANISMOS. (A) solo contaminado com água de produção do petróleo. Coordenadas de GPS do local de coleta: S 10° 39' 45,8" e WO 36° 59' 28,8", elevação 17 m. (B) água de produção do petróleo. Coordenada do GPS do local da coleta: S 10° 39' 50,6" e WO 36° 59' 33,1", elevação 37 m.

#### 4.1.2 Isolamento das cepas

O isolamento das cepas foi realizado em meio seletivo com vaselina líquida como descrito por Lima (1997). O volume de 10 mL de água de produção de petróleo foram adicionados em um frasco Erlenmeyer de 250 mL e 10 g do solo foram adicionados em outro frasco, ambos contendo 90 mL de vaselina estéril (diluição  $10^{-1}$ ). Os frascos foram colocados em um agitador orbital a 250 rpm e 25 °C por 30 min para a interação dos microrganismos com a vaselina. Após este período 1 mL de cada frasco foi transferido para tubos contendo 9 mL de vaselina estéril cada e novamente agitados por igual período (diluição  $10^{-2}$ ). Foram também realizadas diluições de modo que a concentração final de material no meio contendo vaselina ficasse da ordem de  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , a partir das amostras originais. Uma alíquota de 0,5 mL de cada diluição foi transferida para placas de Petri e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski. O meio de cultura da placa foi o Bushnell Hass (BH) composto por (g.L<sup>-1</sup>): 0,2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,02 CaCl<sub>2</sub>; 1,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 1 gota.L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (solução saturada); 3% (m/v) de agar nutriente, e 10% (m/v) de sal marinho (BUSHNELL; HASS, 1941). As placas foram incubadas a 37 °C. As

colônias observadas foram isoladas em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura descrito acima.

#### 4.1.3 Manutenção das cepas

As cepas isoladas foram mantidas em meio líquido Luria-Bertani Miler (LB) composto de: 1% (m/v) triptona, 1% (m/v) NaCl e 0,5% (m/v) extrato de levedura em solução de glicerol 40% (v/v) a  $-18^{\circ}\text{C}$  e repicadas a cada 30 dias, ou quando necessário, em agar tripticaseína de soja (TSA), composição ( $\text{g.L}^{-1}$ ): 15,0 peptona de caseína; 5,0 peptona de soja; 5,0 cloreto de sódio e 15,0 agar.

#### 4.1.4 Coloração de Gram

As cepas isoladas foram submetidas à coloração de Gram, utilizando Cristal Violeta Fenicada, seguindo a metodologia descrita por Gram (1884) e modificada por Bier (1985). Foi realizada a fixação dos microrganismos em lâminas e estas cobertas com solução de cristal violeta por 1 min. Em seguida as lâminas foram lavadas com um filete de água e cobertas com solução de lugol (1:20) por 1 min. O lugol foi escorrido e a lâmina lavada em filete de água corrente. Posteriormente, foi adicionado álcool etílico (99,5° GL) até que não houvesse mais desprendimento de corante (cerca de 30 s) e novamente lavada em água corrente. A lâmina então foi coberta com fucsina de Ziehl por 30 s, lavada com água e secada com o auxílio de um papel de filtro limpo. Uma gota de óleo de imersão foi adicionada sobre o esfregaço fixado e corado e este observado em objetiva de imersão (100×).

#### 4.1.5 *Screening* das cepas produtoras de biosurfactante

O *screening* das cepas isoladas para a produção de biosurfactantes foi realizado através da verificação de suas propriedades de interface [colapso da gota de óleo, tensão superficial (TS), índice de emulsificação ( $E_{24}$ )] em ensaios de FS.

#### 4.1.5.1 Preparo do pré-inóculo

Antes de serem utilizadas para o preparo do pré-inóculo, as cepas foram transferidas para tubos inclinados contendo meio sólido TSA e cultivadas a 37 °C por 24 h. Após este período, duas colônias de cada uma das cepas foram transferidas para 50 mL de meio LB contidos em Erlenmeyers de 250 mL e incubados a 37 °C e 200 rpm durante o tempo necessário para que o crescimento microbiano atingisse a densidade óptica em 600 nm ( $D.O._{600}$ ) entre 0,8-1,0.

#### 4.1.5.2 Fermentação submersa em meio salino mineral

Uma alíquota de 4% (v/v) de pré-inóculo foi inoculada em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio salino mineral estéril (meio de Cooper modificado) (COOPER *et al.*, 1981) composto por ( $g.L^{-1}$ ): 5,67  $Na_2HPO_4$ ; 4,08  $KH_2PO_4$ ; 0,001  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,197  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,002  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,015  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0,39  $(NH_4)_2HPO_4$  como fonte de nitrogênio; como fonte de carbono: 4% (v/v) de glicerol ou 4% (v/v) de glucose, pH inicial ajustado para 7,0. Também foi testado o crescimento do microrganismo na presença de uma alta concentração de NaCl (10% m/v) e também na ausência deste sal. Os frascos foram incubados a 37 °C e 200 rpm em um agitador orbital por 96 h. Em seguida, os meios de cultivo foram centrifugados a  $12500 \times g$  por 10 min a 25 °C para remoção das células, e os sobrenadantes foram submetidos a três metodologias analíticas para detecção da presença de biosurfactante: i) teste do colapso da gota (item 4.6.3, p. 62); ii) medida de TS (item 4.6.4, p. 62); iii) e  $E_{24}$  (item 4.6.6, p. 63).

#### 4.1.6 Identificação da cepa selecionada

Após a seleção da cepa produtora de biosurfactante, esta foi enviada para identificação através de análises do RNA ribossômico 16S, realizadas no CPQBA-Unicamp (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) (Anexo 1).

## 4.2 SELEÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

### 4.2.1 Microrganismos utilizados

Foram utilizadas duas cepas: *Bacillus* sp, isolada de solo contaminado com água de produção de petróleo (Carmópolis, SE) na primeira etapa deste trabalho e, *B. pumilus* UFPEDA 448, originalmente isolada de resíduos de cana-de-açúcar e gentilmente cedida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco. Culturas estoque foram armazenadas em meio líquido LB com glicerol (40%, v/v) a -18°C. O pré-inóculo foi preparado como descrito no item 4.1.5.1 (p. 52) em meio LB.

### 4.2.2 Meio e condições de cultivo para a fermentação em estado sólido

Os ensaios para a FES foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 10 g de substrato sólido seco. Os substratos sólidos utilizados foram: bagaço de cana-de-açúcar, farelo de milho, palha de arroz e okara. Também foram utilizadas misturas na proporção de 50% (m/m) de cada substrato sólido: bagaço de cana e okara, palha de arroz e okara e uma proporção de 9:1 de okara e espuma de poliuretano. O bagaço de cana foi cedido pela Usina de Álcool Melhoramentos (Jussara-PR), o farelo de milho, pela *Corn Products* Brasil (Jundiaí-SP), a palha de arroz, pela Arroz Frias (Apucarana-PR), o okara, pela Cocamar (Maringá-PR) e a espuma de poliuretano foi adquirida no comércio da região de Curitiba-PR.

Preparo dos substratos: o bagaço de cana foi lavado três vezes com água e seco em estufa a 60 °C por 48 h, sendo utilizada a fração retida em tamizes entre 10 e 20 mesh. O okara foi seco em estufa a 60 °C por 48 h, moído em liquidificador e peneirado, obtendo-se uma farinha com granulometria menor que 0,5 mm ou 32 mesh. O farelo de milho e a palha de arroz foram secos em estufa a 60 °C. Utilizou-se espuma de poliuretano de densidade de 33 kg.m<sup>-1</sup> cortada em cubos de 0,5 cm<sup>3</sup>. Estes sólidos foram umedecidos com meio salino mineral (meio de Cooper modificado), o mesmo meio líquido utilizado em FS, embora quando utilizado em FES é referido como solução umedecedora (SU) composto por g.L<sup>-1</sup>: 0,39 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,67 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,08 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,001 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,197 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O;



0,002  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,015  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 4% (m/v) de glicerol, pH inicial ajustado para 7,0 (COOPER *et al.*, 1981).

A solução umedecedora foi adicionada aos substratos sólidos em volume suficiente para atingir a máxima capacidade absorviva, expressa em volume de solução umedecedora por massa de substrato sólido seco (Tabela 6). Os substratos foram umedecidos com a solução umedecedora, esterilizados e inoculados com 4% (v/v) de pré-inóculo e então incubados em estufa bacteriológica a 37 °C. O teor de umidade dos substratos úmidos depois da adição do inóculo foi determinado em balança de infravermelho conforme o item 4.6.7 (p. 63).

TABELA 6. SUBSTRATOS SÓLIDOS E MISTURAS DE SUBSTRATOS SÓLIDOS UTILIZADOS NAS FERMENTAÇÕES EM ESTADO SÓLIDO.

Substratos sólidos	Volume de meio por massa por massa de SS ( $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ )	Umidade (% m/m)
bagaço de cana	5,0	86,4 ± 0,4
palha de arroz	1,5	58,7 ± 0,8
farelo de milho	2,0	62,9 ± 0,4
okara	2,3	83,3 ± 0,5
bagaço de cana + okara	3,7	78,9 ± 0,3
palha de arroz + okara	1,9	65,6 ± 1,3
espuma + okara	2,9	79,9 ± 0,8

#### 4.2.3 Extração do biosurfactante do sólido fermentado

Após o tempo de cultivo, cada frasco contendo o material fermentado recebeu 100 mL de água destilada em temperatura ambiente e foi agitado por 1 h a 200 rpm e 37 °C em agitador orbital para a extração do biosurfactante. Em seguida, a suspensão foi filtrada através de gaze e o excesso de líquido foi prensado manualmente. O extrato foi centrifugado a 12500×g por 10 min a 25 °C e o sobrenadante, denominado extrato aquoso, foi submetido à medida de TS e diluição micelar crítica (DMC) (itens 4.6.4 e 4.6.5, respectivamente, p. 62-63).

#### 4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

A partir deste ponto, todo o trabalho foi realizado utilizando-se a cepa de *B. pumilus*. Esta escolha se deve a três fatores: i) não foi possível a identificação da espécie da cepa de *Bacillus* sp isolada na primeira etapa deste trabalho, fato que

dificultaria ou até impossibilitaria a comparação dos resultados obtidos com a literatura; ii) os resultados obtidos para a cepa de *B. pumilus* durante a seleção do substrato sólido foram ligeiramente superiores aos da cepa de *Bacillus* sp isolada e iii) a composição do lipopeptídeo produzido por *B. pumilus* já havia sido determinada por Bugay (2009), como sendo uma mistura de homólogos correspondente à surfactina A, o que facilitou sua quantificação.

#### 4.3.1 Efeito da adição de hidrolisados protéicos no meio de fermentação

##### 4.3.1.1 Meio e condições de cultivo para fermentação submersa e fermentação em estado sólido

Os ensaios para FS foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio. Foi utilizado o meio salino mineral conforme descrito em 4.1.5.2 (p. 52), com 4% (v/v) de glicerol como fonte de carbono. Em vários experimentos este meio foi suplementado com 5% (m/v) de peptona de soja (Sigma-Aldrich, St. Louis-USA), 10% (m/v) de okara hidrolisado (item 4.3.1.2, p. 56) e 10% (m/v) de okara não hidrolisado. Os meios foram autoclavados por 20 min a 121 °C. Após resfriamento, foram adicionados aos frascos 4% (v/v) de pré-inóculo e incubados a 37 °C e 200 rpm por período oportuno em agitador orbital. Após o cultivo os meios foram centrifugados a 12500×g por 10 min a 25 °C. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à extração com solventes orgânicos e quantificação da surfactina por HPLC, como descrito em 4.6.8 e 4.6.9 (p. 64), respectivamente.

Os ensaios para a FES também foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 5 g de bagaço de cana e suplementado com a solução umedecedora contendo 4% (m/v) de glicerol (item 4.2.2, p. 53). Em alguns experimentos foi adicionado ao bagaço de cana 25 mL de SU contendo 5% (m/v) de peptona de soja, e também misturas de 5 g de bagaço de cana e 50 mL de SU contendo 10% (m/v) de okara, hidrolisado e não hidrolisado. Os frascos foram autoclavados a 121 °C por 20 min. Após o resfriamento, um volume de inóculo igual a 4% (v/v) em relação a solução umedecedora foi adicionado aos frascos e estes foram incubados a 37 °C. Após o tempo de cultivo, o biosurfactante foi extraído do sólido fermentado como descrito em 4.2.3, p. 54) e o extrato aquoso obtido foi

submetido à extração orgânica e quantificação da surfactina por HPLC (ítems 4.6.8 e 4.6.9, respectivamente, p. 64).

#### 4.3.1.2 Hidrólise enzimática das proteínas do okara

Para avaliar o efeito de hidrolisados protéicos no meio de fermentação, foi preparado um hidrolisado de okara a ser utilizado tanto nos cultivos de FS quanto FES. Para o procedimento de hidrólise, foi preparada uma solução a 20% (m/v) de okara em tampão Tris-HCl  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,5. Esta solução foi esterilizada em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 min. Posteriormente, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e uma protease comercial (Alcalase 2,4L® – Novozymes Latin America), foi adicionada à solução na concentração de 0,25% (v/v), com atividade de  $777 \text{ U.mL}^{-1}$  contra azocaseína (CHARNEY; TOMARELLI, 1947). A mistura foi então incubada em agitador orbital por 24 h a  $50^\circ\text{C}$  e 200 rpm para promover a hidrólise das proteínas, sendo a reação paralisada pelo aquecimento da solução a  $100^\circ\text{C}$  por 5 min. A suspensão obtida foi diluída com solução umedecedora para uma concentração de okara de 10% (m/v) e utilizada em ensaios de FS e FES.

#### 4.3.1.3 Medida da atividade de protease

A atividade de protease foi determinada nos extratos aquosos das FS e FES tanto nos meios contendo okara hidrolisado quanto não hidrolisado, através da metodologia descrita por Charney e Tomarelli (1947), onde se adicionou 0,5 mL de extrato aquoso em 1,0 mL de substrato contendo azocaseína a 0,2% (m/v) dissolvida em tampão Tris-HCl ( $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 8,5) a  $70^\circ\text{C}$  por 10 min. A reação foi paralisada por adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 15% (m/v) (TCA) e a mistura foi centrifugada a  $15000\times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$ ; os sobrenadantes foram misturados com 0,5 mL de NaOH  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  e a absorbância lida a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir um aumento de absorbância igual a 0,1 em 60 min, a 420 nm, nas condições do ensaio.

#### 4.3.2 Efeito da composição da solução umedecedora

Foi realizado um estudo de variações na composição da solução umedecedora: foram testadas modificações na fonte de nitrogênio inorgânico  $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3]$ , modificações na fonte de carbono [glicerol ou glucose 4% (m/v)], retirada dos sais, retirada do tampão ou utilização de apenas água para umedecer os sólidos. A proporção dos sólidos utilizados foi mantida em (1:1) de bagaço de cana e okara não hidrolisado, em um total de 10 g de sólido seco, contidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL. O cultivo foi conduzido a 37 °C por 48 h em estufa bacteriológica.

#### 4.3.3 Efeito das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio

Foram utilizadas as mesmas condições descritas no item 4.2.2 (p.53) para o cultivo com okara não hidrolisado, porém com alteração na fonte de nitrogênio inorgânico e fonte de carbono. Foram testados meios sem fonte de nitrogênio inorgânico e com 0,4 e 0,8 g.L<sup>-1</sup> de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e também meios sem nenhuma fonte de carbono adicional e com 4 e 8% (m/v) de glicerol. O cultivo foi conduzido a 37 °C por 48 h em estufa bacteriológica.

#### 4.3.4 Efeito da razão entre os substratos sólidos

Foi estudado o efeito da razão entre bagaço de cana e okara não hidrolisado utilizados como substratos sólidos. Em uma massa total de 10 g de sólido, foram testadas as razões de 7,5:2,5; 5:5 e 2,5:7,5 de bagaço de cana e okara, respectivamente. A quantidade de solução umedecedora utilizada nestes experimentos corresponde à máxima capacidade de absorção de líquidos dos sólidos utilizados (5 mL.g<sup>-1</sup> para o bagaço de cana e 2,3 mL.g<sup>-1</sup> para o okara) (ver Tabela 6, p. 54). A composição da solução umedecedora segue as condições do meio de cultivo controle descrito no item 4.2.2, (p. 53). O cultivo foi conduzido a 37 °C por 48 h em estufa bacteriológica.

#### 4.3.5 Otimização da produção de surfactina em colunas de Raimbault por metodologia de superfície de resposta

Os experimentos em colunas de Raimbault foram conduzidos como descrito no item 4.4 (p. 58). As variáveis estudadas neste delineamento foram: a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ( $X_1$ ) e a proporção em massa/massa da mistura de substratos sólidos (bagaço de cana e okara não hidrolisado) ( $X_2$ ). Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR  $2^2$ ) incluindo 8 ensaios nas condições axiais (+1,41 e +1, níveis superiores, -1 e -1,41, níveis inferiores) com triplicata dos pontos centrais (0, nível médio), totalizando 11 ensaios. Os parâmetros adotados para cada nível foram:  $X_1 = 0,2$  (-1,41), 0,4 (-1), 0,8 (0), 1,2 (+1), 1,4 (+1,41);  $X_2 = 80:20$  (-1,41), 29:71 (-1), 50:50 (0), 71:29 (+1), 20:80 (+1,41). As análises de regressão, de variância e de significância estatística, assim como a construção das superfícies de resposta, foram feitas com o software Statistica versão 6.0 (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

#### 4.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM COLUNAS DE RAIMBAULT

Quatorze gramas (em base seca) de uma mistura 1:1 de bagaço de cana e okara não hidrolisado, previamente umedecido com 55 mL de solução umedecedora foram autoclavados a 121 °C por 20 min. Depois do resfriamento, um volume de inóculo igual a 4% de volume de solução umedecedora foi adicionado. O sólido foi empacotado em colunas de vidro de 20 cm de altura x 4 cm de diâmetro (RAIMBAULT; ALAZARD, 1980) (Figura 12). Os umidificadores de ar foram conectados na base das colunas e estas foram imersas em banho de água a 37 °C (como esquematizado na Figura 13). A umidade inicial do meio foi de 74% (m/m, base úmida). Cada coluna recebeu uma taxa de fluxo de ar de 200 mL.min<sup>-1</sup> (para a pressão atmosférica de Curitiba que é de aproximadamente 0,9 atm). Os níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> foram monitorados nas saídas de ar das colunas com sensores CI-6562 e CI-6561, respectivamente, e registrados usando um software de aquisição de dados CI-6871G (ambos da Pasco®, Roseville-USA).



FIGURA 12. ILUSTRAÇÃO DE UMA COLUNA DE RAIMBAULT PREENCHIDA COM BAGAÇO DE CANA E OKARA E ENCAIXADA NO UMIDIFICADOR.  
FONTE: A AUTORA

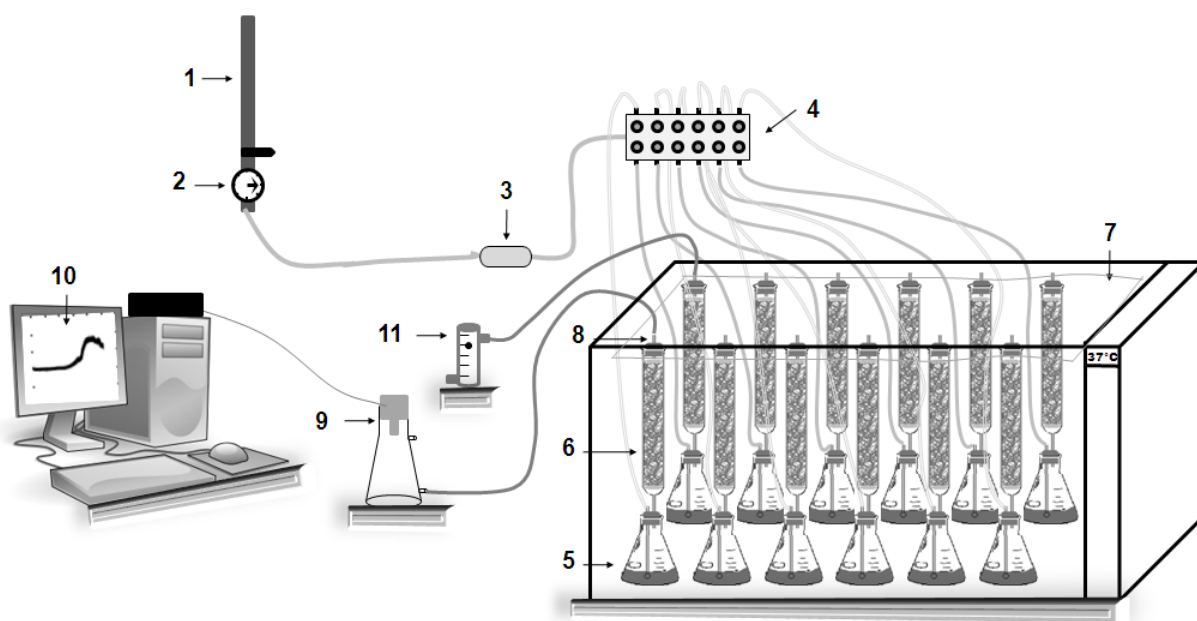


FIGURA 13. ESQUEMA DO BIORREATOR DE COLUNAS DE RAIMBAULT: (1) ar comprimido; (2) regulador de pressão de ar; (3) filtro de ar; (4) distribuidor de ar; (5) umidificador; (6) colunas; (7) banho termostatizado; (8) saída de ar da coluna; (9) sensor de  $O_2$ ; (10) software para aquisição de dados; rotâmetro; (11) rotâmetro.  
FONTE: A AUTORA

## 4.5 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TENSOATIVAS DE SURFACTINA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

As propriedades do biosurfactante em estudo foram determinadas utilizando-se uma solução aquosa ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) de surfactina. A solução foi preparada a partir do extrato orgânico obtido do cultivo em 48 h em colunas de Raimbault a  $37^\circ\text{C}$ , utilizando uma mistura 1:1 (em massa) de bagaço de cana e okara não hidrolisado, nas condições otimizadas.

### 4.5.1 Determinação da concentração micelar crítica

A determinação da concentração micelar crítica (CMC) foi realizada medindo-se a TS através de diluições sucessivas (com água destilada) de uma solução aquosa de  $400 \text{ mg.L}^{-1}$  de surfactina produzida neste trabalho, segundo técnica descrita por Sheppard e Mulligan (1987). Foi então construído um gráfico, plotando-se a TS medida contra a concentração da surfactina, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. As medidas de TS foram determinadas até que os valores obtidos se aproximassem da TS da água destilada ( $70\text{-}72 \text{ mN.m}^{-1}$ ), como descrito no item 4.6.4 (p. 62).

### 4.5.2 Efeito do tratamento térmico nas propriedades tensoativas da surfactina

Foram colocados 5 mL da solução aquosa da surfactina produzida por FES ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em tubos de ensaio e estes submetidos a  $100^\circ\text{C}$  por períodos de 20, 40, 60 e 120 min. Outra amostra da mesma solução também foi aquecida em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por períodos de 20, 40, 60 e 120 min. Após tratamento térmico, os tubos foram resfriados até a temperatura ambiente para medição de TS e DMC, como descrito em 4.6.4 (p. 62). Para as medidas de DMC a solução foi diluída 1/10 ( $\text{DMC}^{-1}$ ) e 1/100 ( $\text{DMC}^{-2}$ ) (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

### 4.5.3 Efeito da força iônica nas propriedades tensoativas da surfacina

A partir de uma solução estoque de surfactina produzida, com concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , foram preparadas duas séries de soluções, de forma que em uma

série a concentração final ficasse em  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  e, na outra, em  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Cada uma das séries também foi preparada de forma que a concentração salina (NaCl) final ficasse em 2,5; 5; 10 e 20% (m/v). Após 30 min de incubação em banho a  $25^\circ\text{C}$  foram medidas a TS,  $\text{DMC}^{-1}$  e  $\text{DMC}^{-2}$ .

#### 4.5.4 Efeito do pH nas propriedades tensoativas da surfactina

A solução aquosa de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de surfactina produzida por FES teve seu pH ajustado para valores de 2, 4, 6, 8, 10 e 12, por meio de adição de HCl  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  ou NaOH  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ . Após 30 min de incubação em banho a  $25^\circ\text{C}$  foram realizadas as medidas de TS,  $\text{DMC}^{-1}$  e  $\text{DMC}^{-2}$ .

#### 4.5.5 Propriedade emulsificante

Os índices de emulsificação ( $E_{24}$ ) foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987), item 4.6.6 (p. 63). Foram testados diferentes hidrocarbonetos (óleo de motor, hexano, heptano, tolueno, gasolina, diesel, querosene) ou óleos vegetais (girassol, dendê, gergelim, soja, canola, milho, arroz, oliva) com a solução aquosa  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  da surfactina produzida.

### 4.6 METODOLOGIA ANALÍTICA

#### 4.6.1 Curva de crescimento dos microrganismos utilizados

Foi utilizado Erlenmeyer de 1000 mL contendo 100 mL de meio LB previamente esterilizado e então inoculado com o pré-inóculo em uma proporção de 4 % (v/v). Para este experimento, o pré-inóculo foi preparado da seguinte forma: sobre uma cultura jovem previamente repicada em placas de TSA foram adicionados 2 mL de água estéril e com o auxílio de uma alça metálica, foi efetuada a raspagem das células para a formação de uma suspensão celular. O volume de 1 mL desta suspensão foi inoculado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio LB e este colocado em agitador orbital a 150 rpm e  $37^\circ\text{C}$ . Ao ser atingida a densidade óptica em 600 nm ( $\text{D.O.}_{600}$ ) entre 0,8-1,0, 4% (v/v) desta suspensão foi inoculada no Erlenmeyer de 1000 mL e imediatamente realizada uma contagem das células em



câmara de Neubauer. A cada 2 h, 1 mL deste meio foi submetido a contagem de células e verificação da D.O.<sub>600</sub>. O experimento foi realizado até que o crescimento dos microrganismos atingisse a fase de declínio. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.6.2 Contagem de células

A quantidade de células inoculada em todos os cultivos realizados neste estudo foi padronizada através de contagem em câmara de Neubauer, colocando-se sobre a lâmina uma gota de células em suspensão e cobrindo-se com lamínula. A leitura foi realizada em microscópio óptico utilizando lente com uma magnificação de 100x (SUSSMAN, 1974).

#### 4.6.3 Teste do colapso da gota

O teste qualitativo do colapso da gota para detecção da produção de biosurfactantes pelas diferentes cepas foi realizado em tampas de microplacas de 96 poços. Os poços das tampas foram untados com 2 µL de óleo de motor 10 W-40 e deixados em repouso por 24 h. Após este período, 5 µL dos sobrenadantes das culturas foram colocados em cada um dos poços e o colapso das gotas foi avaliado após 2 minutos. O resultado foi considerado positivo quando se percebeu visualmente a gota colapsada (YOUSSEF *et al.*, 2004).

#### 4.6.4 Determinação da tensão superficial

A medida da TS foi realizada nos sobrenadantes de cultura da FS e nos extratos aquosos da FES livres de células, utilizando-se o tensiômetro *K12, Processor Tensiometer, Krüss* (Hamburgo, Alemanha). As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado anel de Du Nouy. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. A força adicional exercida sobre o anel no momento em que a lâmina do líquido se rompe dá a medida da tensão superficial (KRÜSS, 1994). As condições de análise padronizadas para todos os ensaios foram: volume médio da

amostra de 40 mL e temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises, medindo-se a tensão superficial da água destilada.

#### 4.6.5 Determinação da diluição micelar crítica

A diluição micelar crítica (DMC) foi utilizada para quantificação indireta da concentração de biosurfactante produzido pelas cepas isoladas na primeira etapa deste estudo.

Para a determinação da DMC foram realizadas medidas da tensão superficial dos sobrenadantes de cultura livre de células, e de suas diluições sucessivas com água destilada até se alcançar a tensão superficial próxima do meio de cultivo no tempo inicial. A produção de biosurfactante será diretamente proporcional ao número de diluições realizadas até que se alcance um valor próximo da tensão superficial do meio de cultura sem inóculo (COOPER *et al.*, 1981; SEN, 1997).

#### 4.6.6 Medida do índice de emulsificação

Para a medida do índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) foram adicionados 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (óleo de motor, hexano, heptano, tolueno, gasolina, diesel, querosene) ou óleos vegetais (girassol, dendê, gergelim, soja, canola, milho, oliva) a 4 mL do extrato aquoso livre de células das FS realizadas na etapa de *screening* ou de uma solução aquosa contendo a surfactina em estudo produzida em FES nas condições otimizadas em colunas de Raimbault. Cada mistura foi agitada vigorosamente por 2 min e então deixada em repouso à temperatura ambiente por 24 h. O  $E_{24}$  foi determinado de acordo com a equação 1, como sendo a altura da camada emulsionada expressa em porcentagem da altura total da coluna de líquido (COOPER; GOLDBERG, 1987).

$$E_{24} = \frac{\text{altura da camada emulsionada (cm)}}{\text{altura total do líquido (cm)}} \cdot 100 \quad (1)$$

#### 4.6.7 Determinação da umidade dos substratos sólidos

Os substratos sólidos foram umedecidos com meio de cultivo, progressivamente, até que a máxima capacidade absorviva fosse atingida. A máxima capacidade absorviva foi determinada como o volume máximo de meio absorvido antes de haver água livre no sistema. É importante ressaltar que as adições de meio ao substrato eram seguidas por etapa de homogeneização e repouso de 45 a 90 min em copo de Becker vedado com parafilme. Uma vez determinada a máxima capacidade absorviva, os substratos foram então umedecidos e a umidade determinada. A umidade dos substratos sólidos foi determinada em balança de infravermelho (Termobalança Top-Ray, Tecnal). Porções de substrato sólido umedecido, de massa entre 1 a 3 g, foram introduzidas no forno de infravermelho da balança e submetidas a 120 °C por 30 min, a umidade do substrato foi calculada como porcentagem em massa de meio contida no substrato (Tabela 6, p. 54).

#### 4.6.8 Extração orgânica do lipopeptídeo

Para fins de quantificação por HPLC, foi realizada a extração do biosurfactante da fase aquosa. Para tanto, inicialmente procedeu-se à acidificação do sobrenadante livre de células da FS ou do extrato aquoso da FES através da adição de HCl 6 mol.L<sup>-1</sup> até pH 2,0. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso por 12 h a 4 °C para a precipitação do biosurfactante. O precipitado foi separado por centrifugação a 12500×g por 10 min a 4 °C, solubilizado em 15 mL de água destilada e o pH ajustado para 7,0 com uma solução de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. A solução resultante foi submetida por três vezes à extração com uma mistura de clorofórmio e metanol [CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (4:1)]. O solvente foi evaporado a uma temperatura de 40 °C em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se a fração residual denominada de extrato orgânico (GHOJAVAND *et al.*, 2008).

#### 4.6.9 Quantificação do lipopeptídeo

A composição do biosurfactante produzido pela cepa de *B. pumilus* foi determinada por Bugay (2009), como sendo uma mistura de homólogos correspondente à surfactina A, o que facilitou sua quantificação.

O biosurfactante presente no extrato orgânico das FS e FES realizadas com *B. pumilus* foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando surfactina comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis-USA) como padrão. As análises de HPLC foram realizadas em um equipamento Waters (Milford-USA), com um detector *Photodiode Array Detector* – Waters 2998, a 205 nm. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e a separação foi feita isocraticamente em uma coluna X-Terra (Waters, Milford-USA) de fase reversa C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 80 Å, com partículas de 5 µm), usando uma mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 3,8 mmol.L<sup>-1</sup> (80:20, v/v) como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> (YEH; WEI; CHANG, 2005). As amostras foram dissolvidas em acetonitrila e metanol (1:1, v/v) (2 mg.mL<sup>-1</sup>) e 20 µL foram usados para a injeção. A concentração da surfactina nas amostras foi calculada pela integração da área total dos picos dos homólogos. O valor de área obtido foi aplicado na equação de regressão calculada através da curva de calibração, fornecendo a concentração de surfactina em 2 mg de amostra. Para saber a concentração total de surfactina produzida no meio de fermentação foi determinada a massa total obtida no extrato orgânico seco e, em seguida foi feita a relação da quantidade de surfactina obtida com aquela calculada pela equação de regressão. O rendimento da surfactina em mg.L<sup>-1</sup> foi calculado dividindo-se a massa de surfactina pelo volume de solução umedecedora utilizada em cada experimento. Para o rendimento da surfactina em g.kg<sup>-1</sup> de sólido seco, a massa de surfactina obtida foi dividida pela massa de substrato sólido utilizado em cada experimento.

#### 4.6.10 Espectrometria de massa com ionização por eletrospray

Os extratos orgânicos obtidos das FS utilizando meio salino mineral e glicerol, e okara não hidrolisado em meio salino mineral e também da FES utilizando bagaço de cana e okara não hidrolisado (1:1) (item 4.3.1.1, p. 55) e a surfactina comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis-USA) foram analisados em um espectrômetro de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS), tipo triplo quadrupolo Quattro LC (Waters, Milford-USA). Os espectros foram gerados em modo íon negativo. As amostras foram dissolvidas em CH<sub>3</sub>Cl:MeOH (1:1, v/v), e alíquotas de 0,1 mL foram removidas e diluídas em 1,9 mL de acetonitrila:água (7:3, v/v), nas quais foram introduzidas por difusão direta por uma seringa a um fluxo de 10 µL.min<sup>-1</sup>, com variação entre capilar

de 2,5 kV e cone de 100 V. Para aquisição dos espectros, utilizou-se uma faixa de massa de m/z 40 a 1200.

#### 4.6.11 Determinação do grau de hidrólise das proteínas do okara

Para a determinação do grau de hidrólise (GH), a suspensão a 20% (m/v) de okara hidrolisado (OKH) e não hidrolisado (OKNH) foi filtrada em gaze a vácuo e centrifugada a 6250×g por 15 min. O GH dos sobrenadantes foi determinado pela reação de Biureto como descrito por Hung *et al.* (1984). O GH é definido como o número total de ligações peptídicas clivadas durante a hidrólise e é calculado conforme a equação (2).

$$GH\% = 100 - \left( \frac{ABS_{OKH}}{ABS_{OKNH}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

#### 4.6.12 Determinação da porosidade do leito de fermentação

O experimento para determinação da porosidade do leito ( $\epsilon$ ) consistiu na adição do substrato (previamente hidratado com a solução umedecedora e autoclavado) em uma proveta de 100 mL. Após a adição do substrato até o volume de 50 mL, adicionou-se 50 mL de água destilada e agitou-se para eliminação do ar presente nos poros do leito. Depois de 30 min, com o assentamento do substrato, foi medido o volume ocupado pelo leito e o volume da água presente no leito. Sabendo o volume ocupado pelos poros no leito e a diferença entre o volume de água adicionada e a água acima do leito, utilizou-se a equação (3) para determinar a porosidade do leito.

$$\epsilon = \frac{(50 \text{ mL} - x)}{50 \text{ mL de leito}} \quad (3)$$

Onde:

$\epsilon$  = porosidade do leito ( $\text{m}^3$ -espaço vazio. $\text{m}^3$ -leito)

x = volume de água acima do volume ocupado pelo leito do substrato (mL)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE CEPAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTE

#### 5.1.1 Isolamento de microrganismos de fontes contaminadas com petróleo

Bactérias produtoras de biosurfactantes apresentam um aumento na hidrofobicidade da superfície celular e, portanto, tendem a aderir na interface entre água e solventes hidrofóbicos (PRUTHI; CAMEOTRA, 1997). Esta característica pode ser usada no isolamento destas bactérias (ROSENBERG; GUTNICK; ROSENBERG, 1980; DILLON *et al.*, 1986). Desta forma, as amostras de solo e água foram colocadas em contato com vaselina líquida, sob agitação. Em seguida, plaqueou-se esta vaselina em meio de cultura BH (item 4.1.2, p. 50). Após 72 h de incubação a 37 °C, cerca de 250 colônias foram observadas na placa contendo amostra de solo na diluição  $10^{-1}$  (9 partes de vaselina para 1 parte de amostra). Por outro lado, a placa contendo amostra de água na diluição  $10^{-1}$  forneceu apenas 4 colônias. Não houve crescimento de microrganismos para as placas com as demais diluições. Foram isoladas as colônias com características morfológicas diferentes (Figura 14), e denominadas provisoriamente de SALPETRO 1A (colônia obtida de água de produção) e SALPETRO 2A, 2B, 2C, 2D e 2E (colônias obtidas do solo contaminado). Todas as cepas foram positivas para a coloração de Gram.

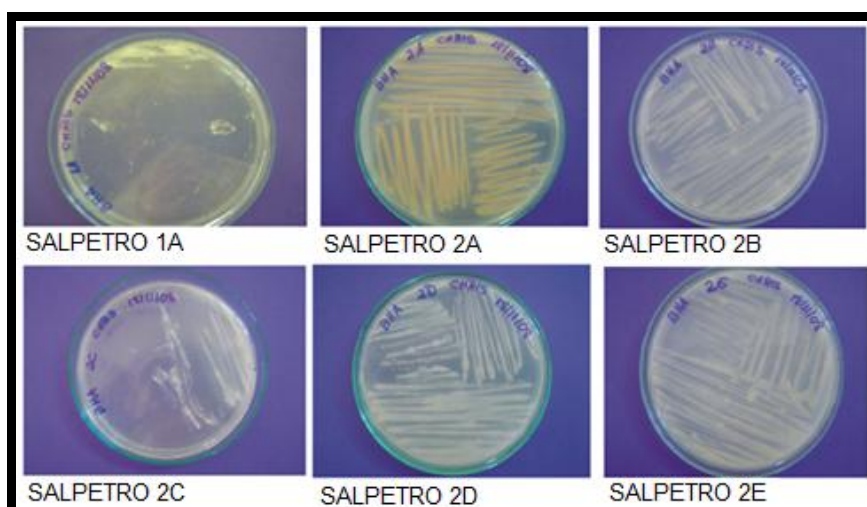


FIGURA 14. MICRORGANISMOS ISOLADOS DE ÁGUA PRODUZIDA (1) E SOLO (2). O meio de cultura utilizado nas placas foi Bushnell Hass (BH) composto por (g L<sup>-1</sup>): 0,2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,02 CaCl<sub>2</sub>; 1,0 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 1 gota/L FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (solução saturada); 3 % (m/v) de agar nutriente, e 10 % (m/v) de sal marinho e deixadas em estufa a 37 °C por 24 h.

### 5.1.2 *Screening* das cepas para produção de biosurfactantes

Para a realização do *screening*, as cepas isoladas foram cultivadas por FS em meio salino mineral (4.1.5.2, p. 52). Como inicialmente procurava-se uma cepa halofílica, foram testadas duas fontes de carbono, glicerol 4% (m/v) e glucose 4% (m/v), e também foi testado o crescimento do microrganismo na presença de uma alta concentração de NaCl (10%, m/v) bem como na ausência deste sal. Foram realizadas três metodologias analíticas: teste do colapso da gota, índice de emulsificação 24 h após o preparo das emulsões ( $E_{24}$ ) e medida da tensão superficial (TS). Apenas a cepa SALPETRO 2D foi positiva para o teste do colapso da gota; este resultado foi obtido somente na ausência de sal, mas ocorreu tanto no meio contendo glicerol quanto no meio contendo glucose (Tabela 7).

Para a determinação do índice de emulsificação ( $E_{24}$ ), foram utilizados como hidrocarbonetos óleo de soja, tolueno e óleo de motor (Tabela 8). Apenas SALPETRO 2D apresentou valores de  $E_{24}$  acima de 20%, com valores de 28 a 35% com tolueno e 52 a 55% com óleo de motor, ambos na ausência de NaCl, em cultivos com glucose e glicerol como fontes de carbono, respectivamente. As cepas SALPETRO 2A, 2C e 2E também foram capazes de formar emulsões, porém, estas emulsões foram bem menos estáveis. Para todas as cepas e com todos os hidrocarbonetos testados, o valor de  $E_{24}$  foi zero para cultivo com 10% (m/v) de NaCl, tanto com glucose como glicerol como fonte de carbono.

TABELA 7. TESTE DO COLAPSO DA GOTA PARA OS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA CONTAMINADOS COM PETRÓLEO.

CEPAS ISOLADAS	COLAPSO DA GOTA			
	Glicerol + 10% NaCl	Glicerol	Glucose + 10% NaCl	Glucose
CONTROLE	negativo	negativo	negativo	negativo
SALPETRO 1A <sup>a</sup>	negativo	negativo	negativo	negativo
SALPETRO 2A <sup>b</sup>	negativo	negativo	negativo	negativo
SALPETRO 2B <sup>b</sup>	negativo	negativo	negativo	negativo
SALPETRO 2C <sup>b</sup>	negativo	negativo	negativo	negativo
SALPETRO 2D <sup>b</sup>	negativo	positivo	negativo	positivo
SALPETRO 2E <sup>b</sup>	negativo	negativo	negativo	negativo

<sup>a</sup> Colônia obtida de água de produção de petróleo. <sup>b</sup> Colônias obtidas de solo contaminado com água de produção de petróleo. Condições de cultivo: meio salino mineral estéril composto por (g.L<sup>-1</sup>): 0,39 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5,67 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,08 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,001 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,197 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,002 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,015 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e como fonte de carbono 4% (m/v) de glicerol ou 4% (m/v) de glucose. Cultura incubada por 96 h a 37 °C e 150 rpm. Controle: meios de cultivo sem inóculo.

TABELA 8. ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO DOS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA CONTAMINADOS COM PETRÓLEO UTILIZANDO GLICEROL E GLUCOSE COMO FONTE DE CARBONO.

CEPAS	ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO ( $E_{24}$ )%					
	Cultivo com Glicerol			Cultivo com Glucose		
	óleo de soja	tolueno	óleo de motor	óleo de soja	tolueno	óleo de motor
CONTROLE	0	0	0	0	0	0
SALPETRO 1A <sup>a</sup>	0	0	2	0	0	3
SALPETRO 2A <sup>b</sup>	2	8	12	1	7	11
SALPETRO 2B <sup>b</sup>	0	5	7	0	4	4
SALPETRO 2C <sup>b</sup>	5	9	18	4	13	15
SALPETRO 2D <sup>b</sup>	8	35	55	8	28	52
SALPETRO 2E <sup>b</sup>	5	9	15	5	7	10

<sup>a</sup> Colônia obtida de água de produção de petróleo. <sup>b</sup> Colônias obtidas de solo contaminado com água de produção de petróleo. As emulsões foram formadas com 6 mL do hidrocarboneto e 4 mL do sobrenadante da fermentação. Leituras realizadas após 24 h do preparo das emulsões. Condições de cultivo: meio salino mineral estéril composto por (g.L<sup>-1</sup>): 0,39 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5,67 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,08 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,001 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,197 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,002 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,015 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e como fonte de carbono 4% (m/v) de glicerol ou 4% (m/v) de glucose. Cultura incubada por 96 h a 37 °C e 150 rpm. Controle: meio de cultivo sem inóculo.

Nas Tabelas 9 e 10 estão apresentados os valores de tensão superficial (TS) medidos nos sobrenadantes dos cultivos depois de 96 h. Uma vez que os componentes do meio também podem afetar a tensão superficial, são apresentados os valores obtidos para os meios sem cultivo. Apenas SALPETRO 2D abaixou a TS do meio, de 41,2 mN.m<sup>-1</sup> para 27,7 mN.m<sup>-1</sup> em meio contendo glicerol e de 33,1 mN.m<sup>-1</sup> para 28,4 mN.m<sup>-1</sup> em meio contendo glucose como fonte de carbono.

TABELA 9. TENSÃO SUPERFICIAL DOS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA CONTAMINADOS COM PETRÓLEO UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO.

CEPAS	TENSÃO SUPERFICIAL (mN.m <sup>-1</sup> )			
	Glicerol + 10% NaCl		Glicerol	
	Controle	Amostra	Controle	Amostra
SALPETRO 1A <sup>a</sup>	42,3 ± 0,8	41,2 ± 0,1	41,2 ± 0,6	39,7 ± 0,2
SALPETRO 2A <sup>b</sup>	41,2 ± 0,7	41,3 ± 0,3	40,7 ± 0,5	38,2 ± 0,4
SALPETRO 2B <sup>b</sup>	40,3 ± 0,8	39,9 ± 0,5	39,3 ± 0,4	39,1 ± 0,7
SALPETRO 2C <sup>b</sup>	41,9 ± 0,1	38,2 ± 0,5	38,8 ± 0,9	40,2 ± 1,0
SALPETRO 2D <sup>b</sup>	41,0 ± 0,2	39,5 ± 0,3	41,2 ± 0,2	27,7 ± 0,5
SALPETRO 2E <sup>b</sup>	39,1 ± 0,6	40,4 ± 0,1	40,9 ± 0,9	37,9 ± 0,7

<sup>a</sup> Colônia obtida de água de produção de petróleo. <sup>b</sup> Colônias obtidas de solo contaminado com água de produção de petróleo. Condições de cultivo: meio salino mineral estéril composto por (g.L<sup>-1</sup>): 0,39 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5,67 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,08 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,001 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,197 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,002 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,015 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e como fonte de carbono 4% (m/v) de glicerol ou 4% (m/v) de glucose. Cultura incubada por 96 h a 37 °C e 150 rpm. Os valores apresentados são as médias dos frascos em triplicata ± o erro padrão da amostra.



TABELA 10. TENSÃO SUPERFICIAL DOS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS CEPAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA UTILIZANDO GLUCOSE COMO FONTE DE CARBONO.

CEPAS	TENSÃO SUPERFICIAL (mN.m <sup>-1</sup> )			
	Glucose + 10% NaCl		Glucose	
	Controle	Amostra	Controle	Amostra
SALPETRO 1A <sup>a</sup>	34,2 ± 0,1	35,1 ± 1,2	33,2 ± 0,2	32,5 ± 0,5
SALPETRO 2A <sup>b</sup>	33,8 ± 0,8	32,2 ± 0,6	31,6 ± 0,1	30,1 ± 0,9
SALPETRO 2B <sup>b</sup>	36,5 ± 0,2	33,8 ± 1,0	32,5 ± 0,6	35,5 ± 1,1
SALPETRO 2C <sup>b</sup>	35,2 ± 0,5	35,5 ± 0,3	34,6 ± 0,8	32,7 ± 0,8
SALPETRO 2D <sup>b</sup>	34,2 ± 0,3	32,2 ± 0,3	33,1 ± 0,1	28,4 ± 0,6
SALPETRO 2E <sup>b</sup>	37,2 ± 0,8	36,1 ± 0,8	32,5 ± 0,7	30,2 ± 0,9

<sup>a</sup> Colônia obtida de água de produção de petróleo. <sup>b</sup> Colônias obtidas de solo contaminado com água de produção de petróleo.

Condições de cultivo: meio salino mineral estéril composto por (g.L<sup>-1</sup>): 0,39 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5,67 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,08 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,001 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,197 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,002 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,015 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e como fonte de carbono 4% (m/v) de glicerol ou 4% (m/v) de glucose. Cultura incubada por 96 h a 37 °C e 150 rpm. Os valores apresentados são as médias dos frascos em triplicata ± o erro padrão da amostra.

A melhor fonte de carbono para a produção do biosurfactante foi o glicerol, com um abaixamento da TS de 32 %, já no meio contendo glucose, a TS baixou em 15 %. Embora a TS dos sobrenadantes de cultivo tanto do meio contendo glicerol quanto glucose sejam equivalentes, o valor da tensão superficial do meio de cultivo sem inóculo contendo glucose foi menor (33,1 mN.m<sup>-1</sup>) que o meio de cultivo contendo glicerol (41,2 mN.m<sup>-1</sup>).

O simples fato de não ter sido observada a presença de biosurfactante nos meios de cultivo onde se utilizou NaCl, não significa que ele não tenha sido produzido. A presença de sais em soluções contendo biosurfactantes pode interagir com estes compostos alterando o poder de redução da tensão superficial. Para afirmar que a presença de sal no meio de cultivo foi responsável pela inibição da produção ou ação do biosurfactante, seria necessário um estudo mais aprofundado sobre a fisiologia do microrganismo, bem como da composição e estrutura do biosurfactante por ele produzido. Desta forma, considerando os resultados obtidos acima, optou-se por realizar os experimentos de seleção de substratos para a FES na ausência de suplementação do meio de cultura com NaCl e utilizando glicerol como fonte de carbono.

A cepa SAPETRO 2D selecionada para estes experimentos foi identificada como pertencente ao gênero *Bacillus*, com 98% de homologia para *Bacillus subtilis*, através de análises do RNA ribossômico 16S, realizadas no CPQBA-Unicamp

(Anexo A). Este gênero é conhecido por produzir biosurfactante do grupo dos lipopeptídeos que se apresentam normalmente em uma mistura de homólogos, sendo obrigatoriamente necessário o conhecimento estrutural e molecular destes compostos para que se possa realizar sua quantificação.

## 5.2 SELEÇÃO DO MEIO DE CULTIVO E DO MICRORGANISMO PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Além da cepa de *Bacillus* sp isolada neste trabalho, também foi utilizada para a seleção de substrato a cepa de *B. pumilus* UFPEDA 448, que já havia apresentado a capacidade de produzir lipopeptídeos em trabalho anterior realizado no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise da UFPR (Bugay, 2009). Como até este momento do trabalho não se conhecia a natureza do biosurfactante produzido pela cepa de *Bacillus* sp, as concentrações dos biosurfactantes produzidos foram determinadas de forma indireta, através da diluição micelar crítica (DMC). O método consiste em diluições seriadas das amostras até atingir-se o valor da CMC. A diluição em que a TS começou a aumentar abruptamente (ou seja, atingiu valores entre 30 e 35 mN.m<sup>-1</sup>) foi indicada como a DMC, onde a quantidade de biosurfactante foi considerada proporcional ao fator de diluição (RAZA *et al.*, 2007; JOSHI; YADAV; DESAI, 2008). Foram testados diferentes resíduos agroindustriais como substratos para produção de biosurfactantes como: palha de arroz, bagaço de cana, farelo de milho e okara (Figura 15). Os substratos utilizados em FES têm a tendência em compactar no leito de fermentação interferindo na transferência de calor e massa, no crescimento do microrganismo e consequentemente produção do biosurfactante. Desta forma, também foram testados o uso do bagaço de cana, palha de arroz e de espuma de poliuretano como *bulking agent*.

O okara, isolado (G) ou em mistura com o bagaço de cana (E) ou espuma de poliuretano (F), foi o melhor substrato sólido para a produção de biosurfactante, proporcionando valores da DMC de 16 para *Bacillus* sp. e DMC de 32 para *B. pumilus* (Tabela 11).

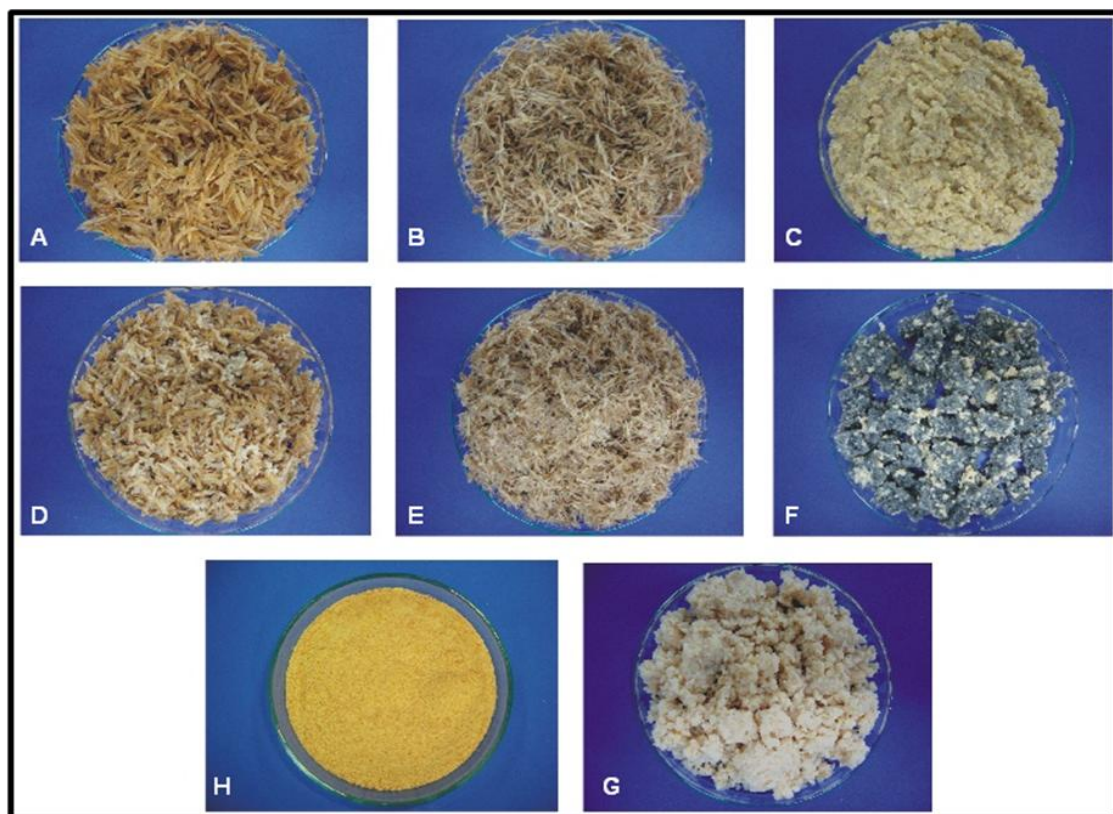


FIGURA 15. SUBSTRATOS SÓLIDOS TESTADOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. (A) palha de arroz (umidade 58%), (B) bagaço de cana (umidade 86%), (C) farelo de milho (umidade 62%), (D) palha de arroz e okara 1:1 (umidade 65%), (E) bagaço de cana e okara 1:1 (umidade 78%), (F) espuma de poliuretano e okara 1:9 (umidade 79%), (G) okara (umidade 83%), (H) aspecto do okara desidratado utilizado durante o desenvolvimento deste trabalho.

TABELA 11. MEDIDA DOS VALORES DE TENSÃO SUPERFICIAL E DILUIÇÃO MICELAR CRÍTICA DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA A SELEÇÃO DE SUBSTRATO SÓLIDO.

SUBSTRATOS	TS (mN.m <sup>-1</sup> )			DMC	
	controle	amostra		<i>Bacillus</i> sp	<i>B. pumilus</i>
		<i>Bacillus</i> sp	<i>B. pumilus</i>		
bagaço de cana	49,1 ± 0,2	40,1 ± 0,2	39,9 ± 0,2	2	2
palha de arroz	50,5 ± 0,8	50,1 ± 0,2	49,1 ± 1,8	1	1
farelo de milho	48,9 ± 0,7	43,1 ± 0,5	40,0 ± 1,5	1	1
okara	45,9 ± 0,1	31,0 ± 0,2	29,3 ± 0,8	16	32
bagaço de cana + okara	46,5 ± 0,8	30,0 ± 0,5	30,8 ± 0,6	16	32
palha de arroz + okara	47,2 ± 0,6	40,9 ± 0,9	39,0 ± 0,1	1	1
espuma + okara	46,5 ± 1,3	32,4 ± 0,6	32,7 ± 0,3	16	32
FS - controle	48,6 ± 0,8	29,2 ± 1,0	28,7 ± 1,5	8	8

O controle corresponde à tensão superficial do meio de cultivo sem inóculo.

Condições de cultivo: 10 g de substrato sólido seco ou misturas 1:1 dos substratos sólidos indicados ou proporção de 9:1 na mistura okara + espuma, todos os meios umedecidos com solução umedecedora. Cultura incubada por 60 h a 37 °C em estufa bacteriológica. FS (fermentação submersa controle): 50 mL de solução umedecedora incubada por 60 h a 37 °C e 200 rpm em agitador orbital. Os resultados de TS são as médias dos frascos em triplicata ± o erro padrão da amostra.

O okara se apresentou como o melhor substrato dentre aos testados possivelmente devido a algumas características próprias, como o alto teor de proteínas. Cepas de *Bacillus* são conhecidas por produzir biosurfactantes do grupo dos lipopeptídeos, cuja síntese da porção peptídica é *de novo*, assim, a presença de fontes protéicas no meio de cultivo pode servir como precursores (KLUGE *et al.*, 1988; PEYPOUX; MICHEL, 1992; BESSON; MICHEL, 1998; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). O okara contém em torno de 25% de proteínas (O'TOOLE, 1999) e, portanto, seria um substrato adequado para a produção de lipopeptídeos, sendo que seus aminoácidos poderiam ser incorporados diretamente na porção peptídica destes biosurfactantes e também por ser um resíduo agroindustrial de baixo custo, cujo principal destino é a alimentação animal.

As características do substrato são importantes quando a intenção é aumentar a escala do processo. Em processos de FES de grande escala, é comum o uso de aeração forçada para favorecer o fornecimento de oxigênio e a remoção do calor metabólico (DURAND, 2003; MITCHELL; VON MEIN; MITCHELL, 2003). Para facilitar a passagem do ar, o substrato deve apresentar uma boa porosidade e não deve compactar durante o processo (VEENANADIG; GOWTHAMAN; KARANTH, 2000; MITCHELL; VON MEIEN; MITCHELL, 2003). Bugay (2009) estudou a utilização de espuma de poliuretano como um suporte inerte (*bulking agent*), juntamente com o okara, para a produção de surfactina em FES. Espuma de poliuretano também já foi utilizada como *bulking agent* em processos de FES por diferentes autores, os quais observaram a melhora na produção dos compostos de interesse em relação a FS ou FES sem o uso do *bulking agent* (ZHU *et al.*, 1994; OOIJKAAS *et al.*, 2000; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). Os autores comentam sobre diversas vantagens que o uso da espuma pode trazer para o processo: servir como suporte para a fixação do microrganismo, possibilitar a transferência de calor e massa no sistema, utilizar menor volume de água em relação aos processos conduzidos em FS. No entanto, a espuma trata-se de um produto comercial, sintético e de biodegradabilidade relativamente baixa, o que pode ser um problema com relação ao ser descarte. Para ser reutilizada, na maior parte dos casos, necessita ser lavada e seca, o que envolve um grande gasto de água e energia.

Outros suportes também são sugeridos para serem utilizados como *bulking agent*: vermiculita, perlita, amberlite, poliestireno, casca de arroz, argila, cânhamo, bagaço de cana (OOIJKAAS *et al.*, 2000).

Camílios Neto *et al.* (2011; 2008) obtiveram bons resultados para a produção do biosurfactante ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* com a adição de bagaço de cana como um *bulking agent* ao meio sólido baseado em farinha de semente de girassol e farelo de milho. Assim, para a continuação deste trabalho, optou-se pela utilização da mistura de okara e bagaço de cana para os experimentos de otimização da produção de lipopeptídeos por FES.

### 5.2.1 Microrganismo selecionado

Na primeira etapa deste trabalho, o objetivo era isolar um novo microrganismo com potencial para produção de biosurfactantes. Buscava-se obter uma cepa capaz de crescer em ambientes com condições extremas de temperatura e salinidade e que pudesse produzir o biosurfactante nestas mesmas condições. Cabe lembrar que uma das principais aplicações propostas para biosurfactantes está na recuperação melhorada de petróleo, que consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos diretamente ou os produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Quando a produção de biosurfactante ocorre *in situ*, os microrganismos devem ser capazes de crescer sob condições ambientais severas, como as encontradas em reservatórios de petróleo, tais como: alta temperatura, pressão, salinidade e baixos níveis de oxigênio. No entanto, apesar de SALPETRO 2D ser capaz de crescer em condições de alta salinidade, não foi eficaz em produzir o biosurfactante nestas mesmas condições.

Como os valores de DMC apresentados na Tabela 11 foram maiores para a cepa de *B. pumilus* UFPEDA 448 e também por já se conhecer a composição do lipopeptídeo que este microrganismo produz, o que facilitou sua quantificação por HPLC, optou-se pela sua utilização para a continuação deste trabalho.

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA

A composição do lipopeptídeo produzido pela cepa de *B. pumilus* foi determinada, por Bugay (2009), como sendo uma mistura de homólogos correspondente à surfactina A, o que facilitou sua quantificação por HPLC. Em seu trabalho, Bugay (2009) obteve uma mistura de cinco homólogos. Estes homólogos apresentam variação da cadeia do ácido graxo de 12 a 16 átomos de carbono e correspondem, respectivamente, aos picos de massa molecular 993, 1007, 1021, 1035 e 1049 obtidos por ESI-MS e que correspondem aos mesmos picos do padrão comercializado pela Sigma-Aldrich (Anexo B).

No presente trabalho, foi utilizado bagaço de cana no lugar de espuma, o que poderia ter ocasionado alteração na composição dos homólogos produzidos. Na Figura 16 está ilustrado o espectro de massa obtido para os homólogos do padrão de surfactina (A) e também dos homólogos obtidos por FS em meio salino mineral (B), FES utilizando apenas okara como substrato (C) e FES utilizando a mistura de okara e bagaço de cana (D).

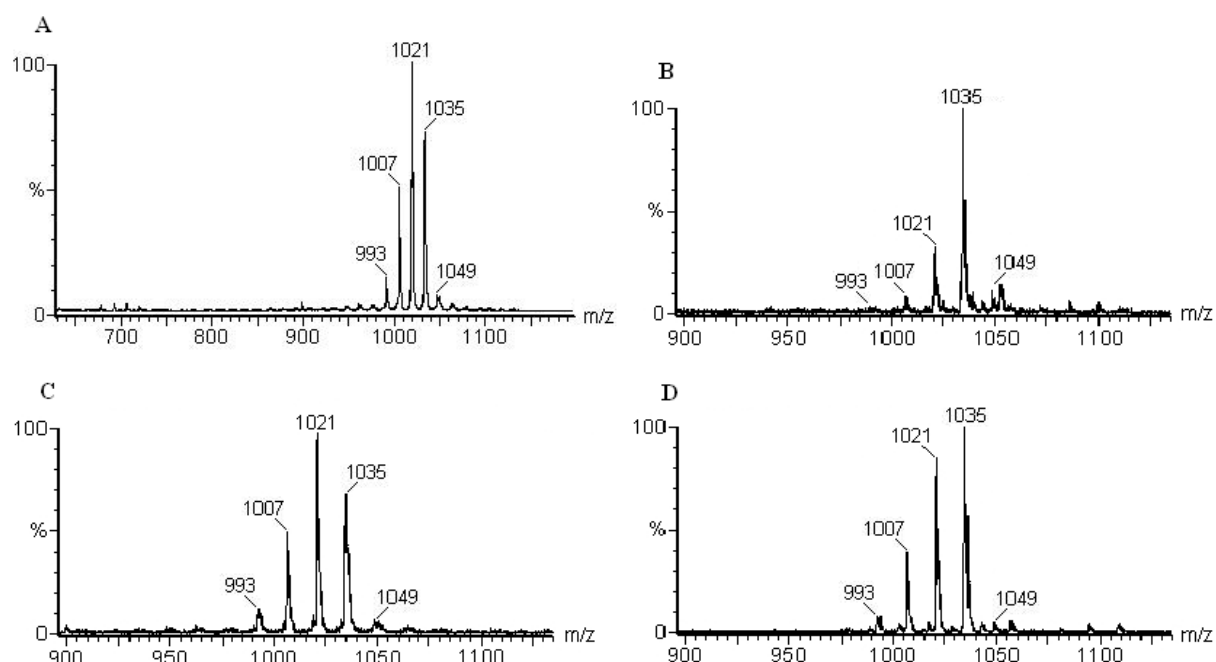


FIGURA 16. DETERMINAÇÃO DOS HOMÓLOGOS PRESENTES NO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448. Espectro de massa (ESI-MS), modo íon negativo, dos biosurfactantes: (A) padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) produzida por *Bacillus subtilis*. (B) extrato orgânico obtido do sobrenadante da FS em meio salino mineral; (C) extrato orgânico obtido a partir do extrato aquoso da FES utilizando okara como substrato; (D) extrato orgânico obtido a partir do extrato aquoso da FES utilizando okara e bagaço de cana como substato.

A cepa de *B. pumilus* UFPEDA 448 produziu os mesmos cinco homólogos em todas as condições testadas e as massas moleculares destes homólogos foram idênticas àsquelas do padrão. Portanto, a presença do bagaço de cana no meio de cultivo não alterou o tipo de biosurfactante produzido. Isto é, o biosurfactante neste estudo pode ser considerado o mesmo produzido por Bugay (2009) e classificado como surfactina. Outro dado que pode reforçar esta afirmação é o perfil de eluição em HPLC dos homólogos do lipopeptídeo produzido pela cepa de *B. pumilus* por FES utilizando okara e bagaço de cana (Figura 17), no qual os tempos de retenção são equivalentes aos obtidos para a surfactina comercial.

Desta forma, foi possível determinar a concentração de surfactina nas amostras, calculada pela integração da área total dos picos dos homólogos obtida em HPLC. A Figura 18 mostra a relação entre a área obtida e a concentração de surfactina correspondente.

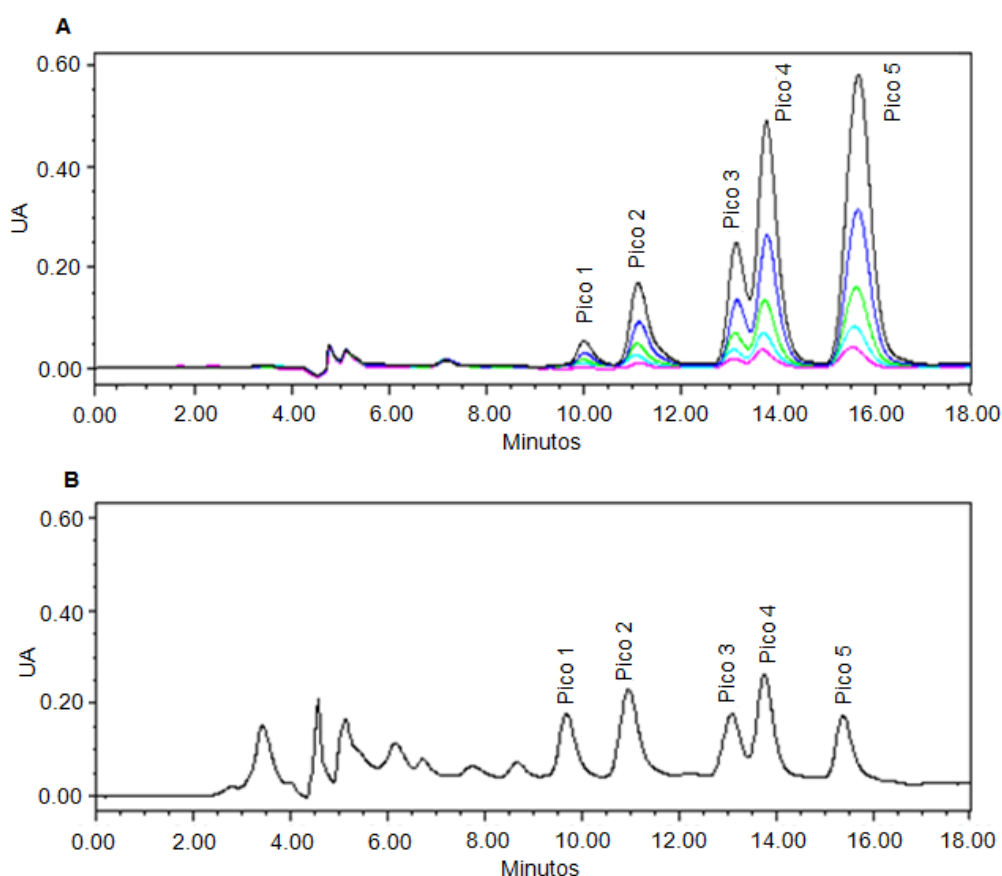


FIGURA 17. PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPLC DOS CINCO HOMÓLOGOS DO LIPOPEPTÍDEO EM ESTUDO. (A) surfactina comercial utilizada como padrão (Sigma-Aldrich); (B) lipopeptídeo de *Bacillus pumilus* produzido por FES utilizando bagaço de cana e okara como substrato, em 48 h de cultivo. Coluna X-Terra de fase reversa C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 80 Å, 5 µm); acetônitrila:ácido trifluoroacético 3,8 mmol.L<sup>-1</sup> (80:20, v/v) como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Detecção em fotodiodo a 205 nm. Tempo de retenção dos 5 picos obtidos: pico A - 10,003 min, pico B - 11,126 min, pico C - 13,164 min, pico D - 13,768 min e pico E - 15,661 min.

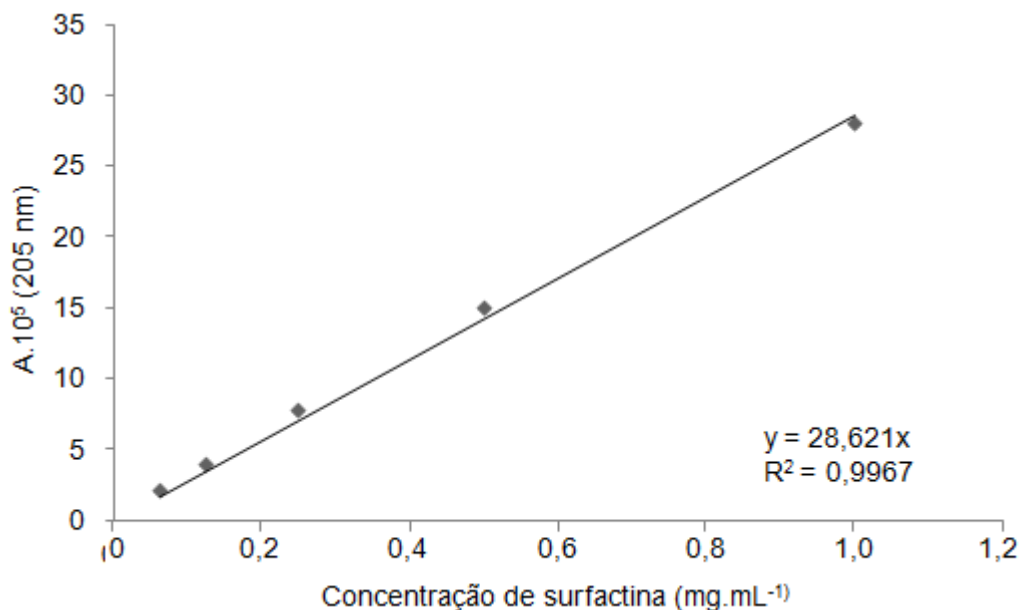


FIGURA 18. CURVA DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO DE SURFACTINA.

## 5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

### 5.4.1 Efeito da pré-hidrólise do okara na produção da surfactina

O okara tem sido utilizado como substrato para a produção de surfactina, e outros lipopeptídeos, em processos tanto de FS quanto em FES (OHNO; ANO; SHODA, 1993, 1995a, 1995b; OHONO; TAKASHI; SHODA, 1996; MIZUMOTO; HIRAI; SHODA, 2006; MIZUMOTO; SHODA, 2007; ANO *et al.*, 2009; BUGAY, 2009). A caracterização físico-química deste resíduo mostrou que ele contém 30% de proteínas (Anexo C), mas muitas destas proteínas são insolúveis (O'TOOLE, 1999). Visto que vários autores têm relatado aumentos na produção de surfactina em FS, usando *B. subtilis* em meio suplementado com aminoácidos livres (KLUGE *et al.*, 1988; BESSON; MICHEL, 1992; PEYPOUX; MICHEL, 1992; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002), o presente trabalho sugere a hipótese de que a pré-hidrólise do okara por uma protease aumentaria os níveis de surfactina. Desta maneira, foi comparada a produção de surfactina utilizando okara “hidrolisado” e “não hidrolisado”, tanto em FS quanto em FES. Como controles positivos, foram realizados cultivos de FS e FES com a adição de peptona de soja comercial (que é produzida usando papaína), que contém uma mistura de peptídeos e aminoácidos livres. Como controle negativo, foi realizada



uma FS com adição apenas de sais minerais e glicerol (ou seja, sem fonte de proteína).

Em FS, a concentração máxima de surfactina em meio salino mineral com glicerol foi  $44 \text{ mg.L}^{-1}$ . Com peptona de soja foi de  $854 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 19), que é consistente com os  $827 \text{ mg.L}^{-1}$  obtidos por Peypoux e Michel (1992) usando um meio baseado em glucose como fonte de carbono e suplementado com aminoácidos. Os valores obtidos com a adição de okara foram intermediários, com a concentração máxima de surfactina com a adição de okara hidrolisado ( $355 \text{ mg.L}^{-1}$ ) sendo quase três vezes maior do que a obtida com a adição de okara não hidrolisado ( $123 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Os níveis de surfactina obtidos foram maiores com a peptona de soja do que com o okara hidrolisado, provavelmente devido ao maior teor de aminoácidos livres presente na peptona de soja: o grau de hidrólise (GH) encontrado para a peptona foi 58%, enquanto o grau de hidrólise para o okara foi somente 18%.

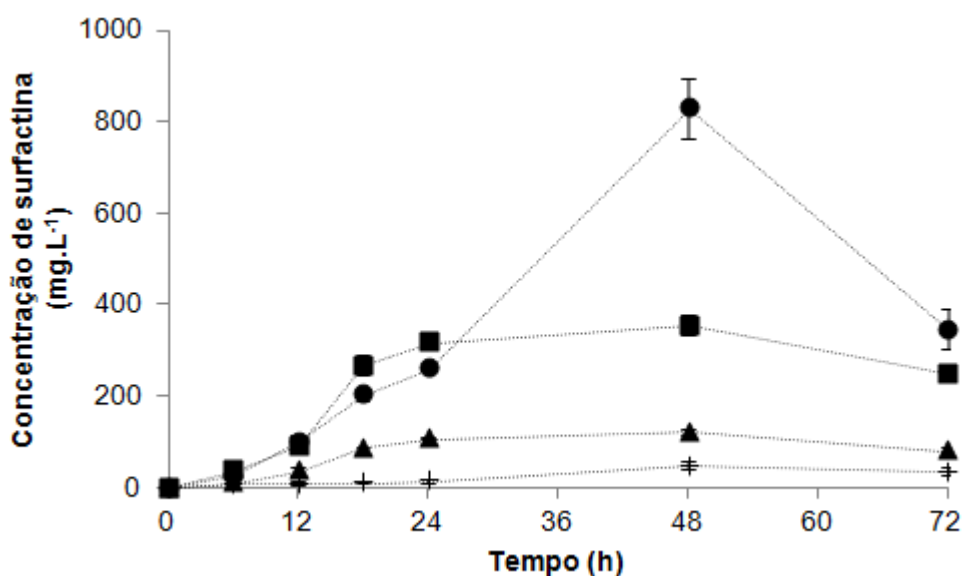


FIGURA 18. EFEITO DA ADIÇÃO DE OKARA HIDROLISADO NA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM MEIO SALINO MINERAL COM GLICEROL EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA. O meio continha, adicionalmente, (●) 5% (m/v) peptona de soja, (■) 10% (m/v) okara hidrolisado, (▲) 10% (m/v) okara não hidrolisado ou (+) nada. Os valores plotados são as médias dos frascos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

No caso da FES, Camilios Neto *et al.* (2008) recomendaram relatar a concentração de biosurfactante com base no volume de solução umedecedora (SU) (isto é, como  $\text{mg.L-SU}^{-1}$ ), para facilitar sua comparação com os resultados obtidos em FS. A concentração máxima de surfactina obtida com a adição de peptona de

soja foi de  $1268 \text{ mg.L-SU}^{-1}$  (Figura 20). A concentração de surfactina obtida com a adição de okara foi menor que este valor, mas, ao contrário do que ocorreu na FS, há relativamente pouca diferença nos perfis obtidos com o okara hidrolisado e não hidrolisado, com as concentrações máximas de surfactina de  $382 \text{ mg.L-SU}^{-1}$  e  $340 \text{ mg.L-SU}^{-1}$ , respectivamente (Figura 19).

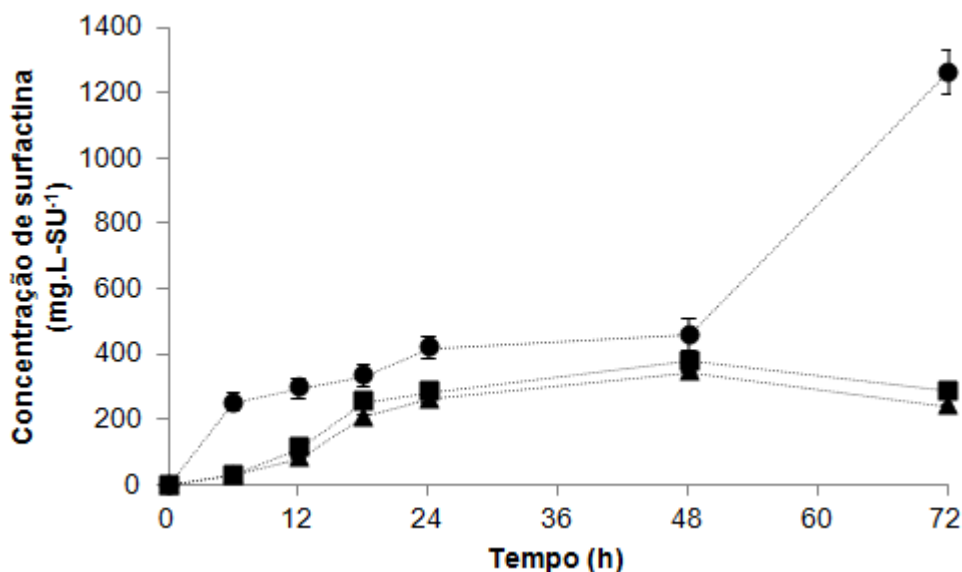


FIGURA 20. EFEITO DA ADIÇÃO DE OKARA HIDROLISADO NA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM MEIO SALINO MINERAL COM GLICEROL EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO. A solução umedecedora continha, adicionalmente, (●) 5% (m/v) peptona de soja, (■) 10% (m/v) okara hidrolisado ou (▲) 10% (m/v) okara não hidrolisado. Os valores plotados são as médias dos frascos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

Com a finalidade de tentar entender estes resultados, as atividades de protease durante o cultivo foram determinadas. Os cultivos com peptona de soja apresentaram baixa atividade de protease, alcançando níveis de cerca de  $79 \text{ U.mL}^{-1}$  para a FS e  $87 \text{ U.mL-SU}^{-1}$  para a FES em 72 h de cultivo (Figura 21). Os resultados com okara (Figura 22) fornecem uma visão do porquê a pré-hidrólise não foi tão eficaz na FES como ocorreu na FS: a produção de protease foi significativamente maior para a FES do que o cultivo correspondente em FS. Especificamente, para o okara não hidrolisado, em 72 h de cultivo, a atividade de protease foi 11,6 vezes maior para a FES ( $442 \text{ U.mL-SU}^{-1}$ ) em relação à FS ( $38 \text{ U.mL}^{-1}$ ), enquanto que para o okara hidrolisado, em 72 h de cultivo, a atividade de protease foi 4,4 vezes maior para a FES ( $356 \text{ U.mL-SU}^{-1}$ ) do que para a FS ( $82 \text{ U.mL}^{-1}$ ).

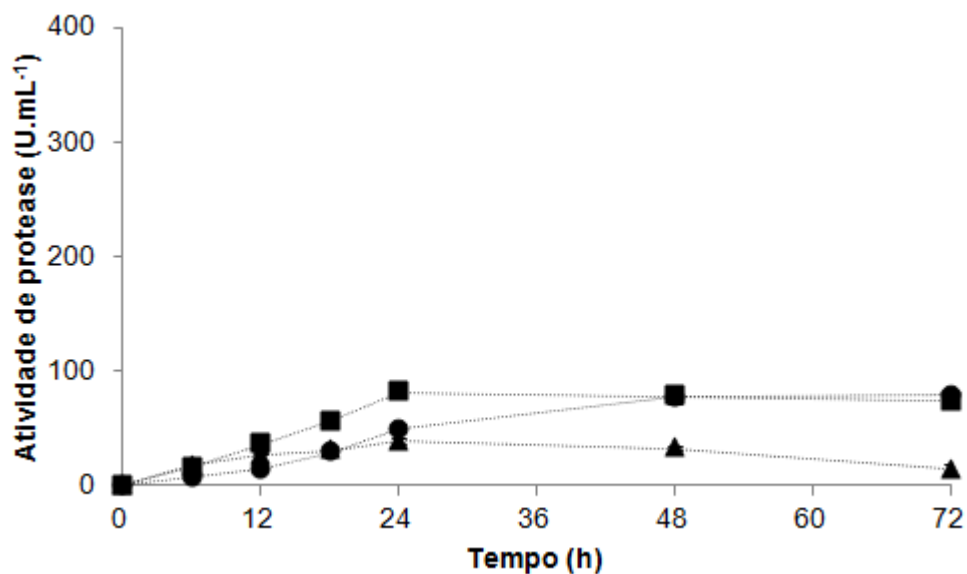


FIGURA 21. ATIVIDADE DE PROTEASE DURANTE O CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA. O meio continha, adicionalmente, (●) 5% (m/v) peptona de soja, (■) 10% (m/v) okara hidrolisado ou (▲) 10% (m/v) okara não hidrolisado. Os valores plotados são as médias dos frascos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

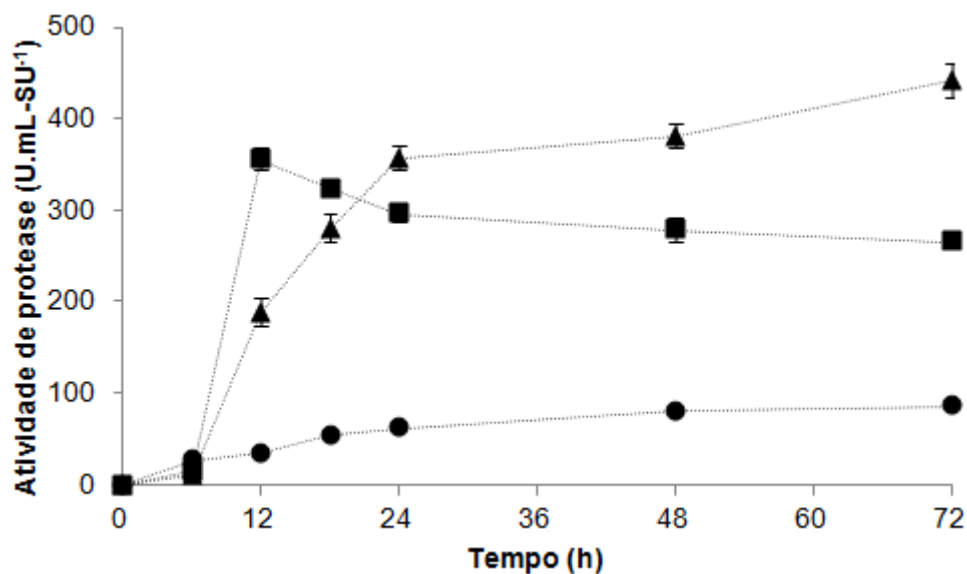


FIGURA 21. ATIVIDADE DE PROTEASE DURANTE O CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO. A solução umedecedora continha, adicionalmente, (●) 5% (m/v) peptona de soja, (■) 10% (m/v) okara hidrolisado ou (▲) 10% (m/v) okara não hidrolisado. Os valores plotados são as médias dos frascos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

A hipótese de que o tratamento do okara com protease poderia estimular a produção de níveis mais elevados de surfactina é verdadeira para a FS, porém o mesmo comportamento não ocorre em FES. Mesmo adicionando okara não hidrolisado a uma FES, a maior atividade proteolítica encontrada na FES fornece

hidrólise suficiente do okara para estimular a produção de surfactina. No caso da FS, as baixas atividades proteolíticas encontradas não levam à hidrólise eficaz do okara durante a fermentação em si, sendo necessária uma etapa de pré-hidrólise do okara para estimular a produção de surfactina. Neste sentido, novos estudos deveriam ser realizados para alcançar um maior grau de hidrólise do okara e desta forma substituir a peptona de soja, com a finalidade de diminuir os custos do processo.

Visto que uma das motivações do presente trabalho foi o de reduzir os custos de produção de lipopeptídeos, a adição de peptona de soja não foi considerada para os estudos restantes. Dado que na FES não houve diferença significativa na produção de surfactina por *B. pumilus* com okara hidrolisado e não hidrolisado, os demais experimentos foram feitos com a adição de okara não hidrolisado ao bagaço de cana.

#### 5.4.2 Efeito da temperatura na produção de surfactina por *Bacillus pumilus* em fermentação em estado sólido

Na investigação do efeito da temperatura sobre a produção da surfactina por *B. pumilus* em FES, o nível mais alto, 484 mg.L-SU<sup>-1</sup> a 60 h, ocorreu a 37 °C (Figura 23) e assim, esta temperatura foi selecionada para os experimentos de otimização. A 45 °C, o nível de surfactina chegou a um valor de 108 mg.L-SU<sup>-1</sup> em 36 h e então diminuiu. Em ambas 25 °C e 30 °C, no final do experimento (72 h) a concentração de surfactina ainda estava aumentando, mas a produtividade foi relativamente baixa. Na verdade, a maior produtividade, de 9,3 mg.L-SU<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> foi obtida em 48 h de cultivo a 37 °C. O teor de umidade do meio permaneceu dentro da faixa de 69-73% (m/m, base úmida) para incubação a 25 °C, 30 °C e 37 °C. A 45 °C o teor de umidade atingiu 60% em 48 h de cultivo.

É importante lembrar aqui que a surfactina produzida por *B. pumilus* é uma mistura de cinco homólogos, com o número total de átomos de carbono na cadeia de ácidos graxos variando de 12 até 16 (chamadas aqui de C<sub>12</sub> a C<sub>16</sub>). Note-se que as cadeias de carbono dos ácidos graxos podem estar em uma das três configurações: *n* (totalmente linear), *iso* (um grupo metila no penúltimo carbono) ou *anteiso* (um grupo metila no antepenúltimo carbono) (BUGAY, 2009).

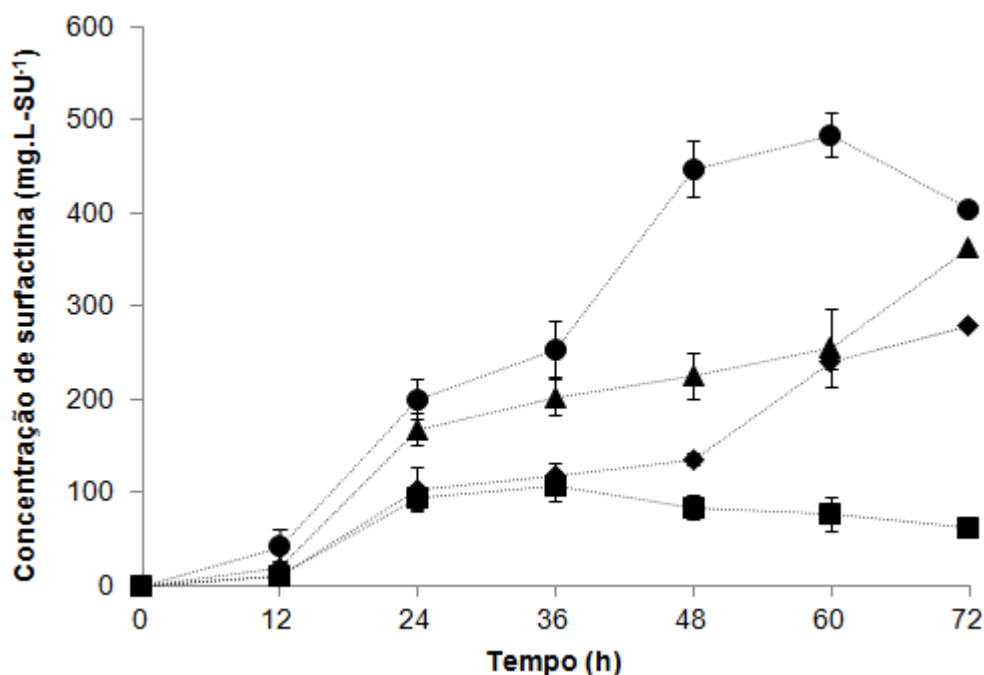


FIGURA 23. EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE SURFACTINA DE *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. Legenda: (◆) 25 °C, (▲) 30 °C, (●) 37 °C, (■) 45 °C. O meio foi 50% bagaço de cana e 50% okara umedecido com a solução umedecedora contendo sais minerais e 4% (m/v) de glicerol. O teor de umidade inicial foi de 73% (m/m, base úmida). Os valores plotados são as médias dos frascos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

A temperatura de cultivo afeta as velocidades relativas de produção dos vários homólogos, como pode ser observado pelos resultados obtidos pelas análises de HPLC (Figura 24). Entre 25 °C e 30 °C a produção de surfactina total bem como a proporção de cada homólogo é semelhante, sendo que a maior diferença é observada para a produção do homólogo C<sub>16</sub>, que a 30 °C corresponde ao maior pico em 72 h de cultivo (111 mg.L-SU<sup>-1</sup>), enquanto que a 25 °C este pico apresentou valores inferiores a 50 mg.L-SU<sup>-1</sup>. Em 37 °C, temperatura na qual foi obtida a maior concentração de surfactina total (484 mg.L<sup>-1</sup>-SU), o homólogo mais abundante foi o C<sub>12</sub> (129 mg.L-SU<sup>-1</sup>), seguido de C<sub>13</sub> e C<sub>15</sub> (ambos 113 mg.L-SU<sup>-1</sup>), nesta temperatura, a concentração obtida para C<sub>16</sub> foi de apenas 69 mg.L-SU<sup>-1</sup>. A diferença mais marcante foi observada a 45 °C: a essa temperatura C<sub>16</sub> não foi detectado e C<sub>14</sub> chegou ao nível de apenas 3,5 mg.L-SU<sup>-1</sup> em 36 h, enquanto que estes dois homólogos atingiram níveis de pelo menos 40 mg.L-SU<sup>-1</sup> em temperaturas mais baixas.

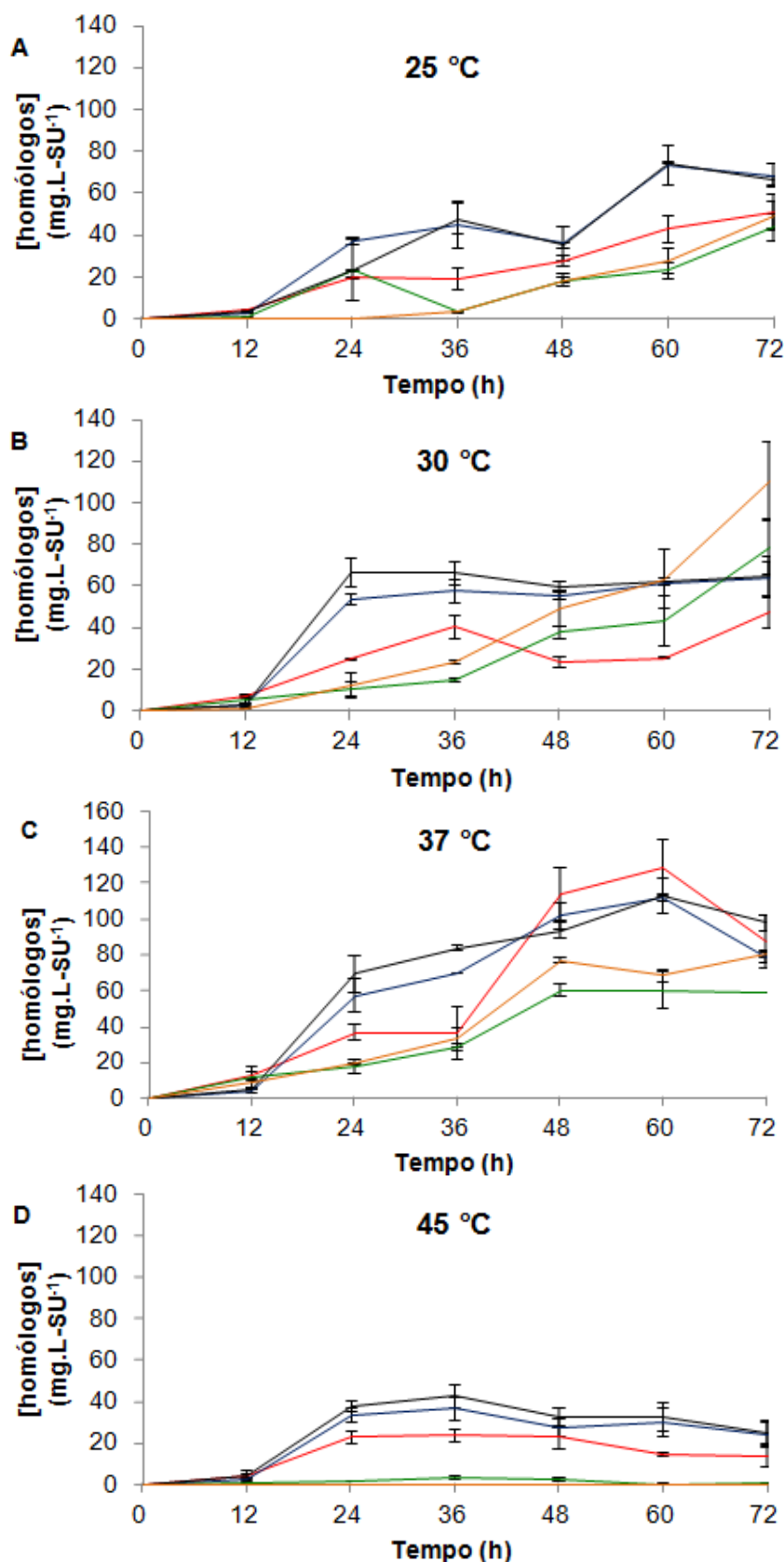


FIGURA 24. EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE HOMÓLOGOS DA SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. Culturas foram incubadas em (A) 25 °C; (B) 30 °C; (C) 37 °C; (D) 45 °C. Legenda: Picos obtidos nas análises em HPLC, (linhas vermelhas) Pico 1, homólogo C<sub>12</sub>; (linhas azuis) Pico 2, homólogo C<sub>13</sub>; (linhas verdes) Pico 3, homólogo C<sub>14</sub>; (linhas pretas) Pico 4, homólogo C<sub>15</sub>; (linhas laranjas) Pico 5, homólogo C<sub>16</sub>. Os valores plotados são as médias dos frascos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

Nesta investigação sobre o efeito da temperatura para a produção de surfactina, foi mostrado pela primeira vez que as proporções dos homólogos de surfactina produzidos dependem da temperatura de incubação. Este resultado pode ter conseqüências para a produção comercial de surfactina por FES já que o controle da temperatura do leito é muitas vezes difícil em larga escala. Até o momento, é relatado na literatura um único estudo sobre o efeito da temperatura na produção de homólogos de lipopeptídeos em FES, realizado por Ohno, Ano e Shoda (1995b) e envolvendo os homólogos de iturina A. Esses autores mostraram que um aumento na temperatura de cultivo de 23 °C para 37 °C diminuiu a proporção do homólogo *n*-C<sub>14</sub> de iturina A e aumentou a proporção do homólogo *n*-C<sub>16</sub>, enquanto que as proporções dos homólogos *anteiso*-C<sub>15</sub>, *iso*-C<sub>15</sub> e *iso*-C<sub>16</sub> permaneceram essencialmente constantes. No presente trabalho, o homólogo C<sub>15</sub> foi consistentemente entre os homólogos mais abundantes, em todas as temperaturas testadas (ver as curvas em preto na Figura 24). Isto não é surpreendente, as porções de ácidos graxos de lipopeptídeos são sintetizadas *de novo*, usando vias metabólicas comuns àquelas para a síntese de ácidos graxos destinados à membrana celular (MENKHAUS *et al.*, 1993) e no caso de *B. subtilis*, o ácido 13-metiltetradecanóico (*iso*-C<sub>15</sub>) é o homólogo mais abundante da membrana (KANEDA, 1972). A grande redução do nível do homólogo C<sub>14</sub> e o desaparecimento de C<sub>16</sub> a 45 °C no presente trabalho podem simplesmente refletir o efeito da temperatura na síntese de ácidos graxos para a membrana celular. Vários estudos sobre o efeito da temperatura sobre a composição da membrana celular de espécies de *Bacillus* têm sido realizados, embora não forneçam informações suficientes para obter uma regra geral (BERTSCH; BONSEN; KOMBERG, 1969; YAO; WALKER; LILLARD, 1970; KANEDA, 1972).

#### 5.4.3 Cinética de produção de surfactina em colunas de Raimbault

A cinética de produção de surfactina em colunas de Raimbault foi estudada com o objetivo de verificar se a aeração forçada favorece a produção do lipopeptídeo. Neste sistema, com aeração forçada de 200 mL.min<sup>-1</sup>, *B. pumilus* produziu uma concentração de surfactina de 646 mg.L-SU<sup>-1</sup> em 56 h (Figura 25). Nas mesmas condições, mas na ausência de aeração forçada, o nível máximo foi somente 484 mg.L-SU<sup>-1</sup> (veja os resultados para 37 °C na Figura 23).

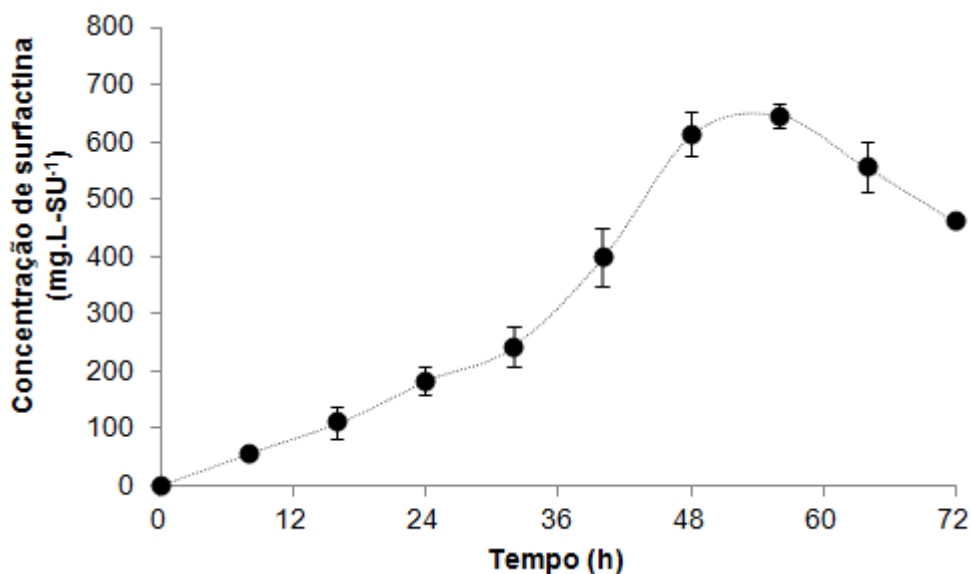


FIGURA 25. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM COLUNAS DE RAIMBAULT. O meio de cultivo foi preparado com mistura 1:1 (m/m) de bagaço de cana e okara impregnados com a solução umedecedora contendo em g.L<sup>-1</sup>: 0,39 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,67 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,08 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,001 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,197 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,002 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,015 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 4% (m/v) de glicerol. O cultivo foi conduzido a 37 °C, com um fluxo de ar ascendente de 200 mL.min<sup>-1</sup> e pressão de 0,9 atm. Os valores plotados são as médias dos frascos em triplicata ± o erro padrão da média

Assim, optou-se por utilizar as colunas de Raimbault para os experimentos de otimização por Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup>. No entanto, primeiramente, foram realizados testes preliminares em frascos Erlenmeyers para identificar os fatores que mais afetam a produção de surfactina.

#### 5.4.4 Efeito na variação da composição do meio de cultivo controle na produção de surfactina por *Bacillus pumilus* em fermentação em estado sólido

Neste estudo, foram testadas diversas modificações nas condições do meio de cultivo utilizadas como controle (Figura 22 a 37 °C) para a produção de surfactina por FES. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers e todas as modificações estudadas, bem como os rendimentos de surfactina obtidos, estão apresentadas na Tabela 12.



TABELA 12. VARIAÇÕES NO MEIO DE CULTIVO CONTROLE PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SOLIDO.

MODIFICAÇÕES NA CONDIÇÃO CONTROLE	[SURFACTINA] mg.L-SU <sup>-1</sup>
Controle	484 ± 40
Controle, sem os sais na SU	96 ± 25
Controle, sem o tampão na SU	66 ± 18
Controle, sem os sais e sem o tampão na SU	34 ± 16
Controle, substituindo 0,4 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> por 0,5 g.L <sup>-1</sup> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> na SU	228 ± 25
Controle, sem fonte de N inorgânico na SU	298 ± 30
Controle, utilizando 0,8 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> na SU	570 ± 49
Controle, substituindo 4% (m/v) de glicerol por 4% (m/v) de glucose na SU	247 ± 11
Controle, sem fonte de carbono na SU	211 ± 53
Controle, utilizando 8% (m/v) de glicerol na SU	230 ± 42
Controle, mas com razão de bagaço de cana e okara (7,5:2,5)	327 ± 25
Controle, mas com razão de bagaço de cana e okara (2,5:7,5)	215 ± 30

Controle: 50% bagaço de cana e 50% okara. Composição da solução umedecedora em g.L<sup>-1</sup>: 0,39 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5,67 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,08 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,001 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,197 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,002 MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,015 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 4% (m/v) de glicerol. Cultivos conduzidos por 48 h a 37 °C em estufa bacteriológica. SU: solução umedecedora.

Os resultados são as médias dos frascos em triplicata ± o erro padrão da amostra.

#### 5.4.4.1 Efeito da composição da solução umedecedora

A solução umedecedora utilizada neste trabalho consiste do meio de Cooper modificado (Item 4.1.5.2, p. 52), utilizado por Bugay (2009) para a produção de surfactina por FES. Com o objetivo de diminuir o custo do processo bem como aumentar a produção do lipopeptídeo, foram testadas modificações neste meio, como: efeito na composição da fonte de nitrogênio inorgânico [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>]; efeito na composição da fonte de carbono (glicerol e glucose), retirada dos sais, retirada do tampão ou utilização de apenas água para umedecer os sólidos.

Conforme observado na Tabela 12, a substituição das fontes de nitrogênio inorgânico e de carbono acarretou uma diminuição na produção do lipopeptídeo da ordem de 2 vezes (484 mg.L-SU<sup>-1</sup> no controle para 228 mg.L-SU<sup>-1</sup> quando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> foi substituído por NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 247 mg.L-SU<sup>-1</sup> quando o glicerol foi substituído por glucose).

Vários autores utilizam NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio inorgânico para a produção de surfactina por *B. subtilis* em FS (WEI; CHU, 1998; YEH; WEI; CHANG, 2005, 2006; WEI; LAI; CHANG, 2007). A metodologia original descrita por Cooper et

*al.* (1981) também sugere a utilização de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , no entanto, nenhum destes autores relata uma triagem que justifique a escolha da fonte de nitrogênio. Em FES, de todos os trabalhos relatados na Tabela 5, apenas Das e Mukherjee (2007) suplementaram o meio de cultivo com fonte de nitrogênio inorgânico, também utilizando  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Já em relação à fonte de carbono, todos os trabalhos realizados para a produção de lipopeptídeos por cepas de *Bacillus* em FES utilizaram glucose (OHNO; ANO; SHODA, 1992; 1993; 1995a; 1995b; OHNO; TAKASHI; SHODA, 1996; VEENANADIG; GOWTHAMAN; KARANTH, 2000; MIZUMOTO; HIRAI; SHODA, 2006; DAS; MUKHERJEE, 2007; MIZUMOTO; SHODA, 2007; SHIH *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008 ANO *et al.*, 2009). Segundo Peypoux, Bonmatin e Wallach (1999), a adição de glicerol como fonte de carbono em FS (utilizado na condição controle) diminui muito a produção de surfactina por cepas de *Bacillus*, o que não foi observado no presente trabalho.

A utilização de solução tampão sem os sais, solução com os sais sem o tampão ou apenas água na solução umedecedora levou a uma diminuição significativa na produção da surfactina em todas as combinações testadas. Desta forma, estes componentes da solução umedecedora foram mantidos.

#### 5.4.4.2 Efeito das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio

Nestes experimentos, foi verificado o efeito causado pelo aumento ou diminuição nas concentrações de glicerol e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , utilizados como fonte de carbono e de nitrogênio inorgânico, respectivamente. Um aumento na concentração  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  elevou a concentração da surfactina de 484  $\text{mg.L-SU}^{-1}$  (controle) para 570  $\text{mg.L-SU}^{-1}$ , sendo que a redução na concentração deste sal foi responsável por uma queda no rendimento da surfactina para 298  $\text{mg.L-SU}^{-1}$  (Tabela 12).

Este resultado indica que, além da fonte de nitrogênio existente no okara (Anexo C), é necessário suplementar o meio de cultivo com uma fonte de nitrogênio inorgânico. Desai e Banat (1997) fizeram uma revisão sobre a produção de surfactantes microbianos em FS e mostraram que existem contradições sobre a necessidade de suplementação do meio de cultivo com nitrogênio para a produção de surfactina. Na maioria dos trabalhos não foi observada melhora no rendimento do lipopeptídeo, e apenas o aumento da concentração de aminoácidos hidrofóbicos como única fonte de nitrogênio levou a sua incorporação direta na surfactina

produzida e em maior concentração. De um modo geral, quando são produzidos lipopeptídeos, é necessário suplementar o meio de cultivo com aminoácidos (KLUGE *et al.*, 1988; BESSON; MICHEL, 1992; PEYPOUX; MICHEL, 1992; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002); no entanto, não há nenhuma referência sobre o aumento da concentração da fonte de nitrogênio inorgânico além daquela que já é normalmente utilizada (aproximadamente  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ).

Com relação à fonte de carbono, um aumento na concentração de glicerol causou um decréscimo na produção de surfactina de  $484 \text{ mg.L-SU}^{-1}$  (controle) para  $230 \text{ mg.L-SU}^{-1}$ . Quando o glicerol foi retirado do meio de fermentação, também ocorreu redução na produção de surfactina, para  $211 \text{ mg.L-SU}^{-1}$  (Tabela 12). Peupoux, Bonmatin e Wallach (1999) apontam que a presença de glicerol no meio de cultivo em FS como única fonte de carbono diminui o rendimento da surfactina, porém, não fazem nenhum comentário sobre os motivos que levam a este decréscimo.

#### 5.4.4.3 Efeito da proporção dos substratos sólidos

O controle, onde se utiliza 50% de cada substrato, foi a melhor condição para a produção da surfactina ( $484 \text{ mg.L-SU}^{-1}$ ), com redução na produção do lipopeptídeo ( $327 \text{ mg.L-SU}^{-1}$ ) quando foi utilizada a proporção de bagaço de cana e okara de 7,5:2,5 (Tabela 12). Quando foi testada a proporção de bagaço de cana e okara 2,5:7,5 a redução foi mais acentuada ( $215 \text{ mg.L-SU}^{-1}$ ). Uma vez que o okara está sendo utilizado como substrato é de se esperar que seu uso em menor quantidade não seja favorável a uma alta concentração de surfactina, pois limita a quantidade de nutrientes para o crescimento do microrganismo e também a quantidade de aminoácidos precursores da porção peptídica da surfactina. No entanto, a presença de uma quantidade muito grande de okara também pode ser problemática, pois este substrato tem tendência em compactar no leito de fermentação, dificultando ao microrganismo acesso aos nutrientes, levando a redução do seu crescimento e consequentemente queda na produção da surfactina.

#### 5.4.5 Otimização da produção de surfactina por metodologia de superfície de resposta em colunas de Raimbault

No experimento preliminar, a concentração da fonte de nitrogênio inorgânico e a proporção entre os substratos sólidos foram os fatores que mais influenciaram a produção de surfactina (Tabela 12). Desta forma, optou-se por utilizar a metodologia de superfície de resposta para avaliar a influência destes dois fatores na produção de surfactina por FES. Com este propósito, utilizou-se um delineamento composto central rotacional, consistindo de um planejamento fatorial completo de dois níveis ( $2^2$ ), incluindo quatro pontos axiais e um ponto central em triplicata, centrados nas melhores condições obtidas na Tabela 12: proporção de sólidos de 50% okara e 50% bagaço de cana, concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$   $0,8 \text{ g.L}^{-1}$  e concentração de glicerol 4% (m/v), experimentos realizados em colunas de Raimbault, com aeração forçada de  $200 \text{ mL.min}^{-1}$ , a  $37^\circ\text{C}$ .

As variáveis independentes foram: a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  na solução umedecedora ( $\text{g.L}^{-1}$ ), representada pela variável codificada  $X_1$  e a proporção em massa de okara e bagaço de cana (% contribuição por massa), representada pela variável codificada  $X_2$ .

A Tabela 13 apresenta os valores das variáveis independentes originais e codificadas, bem como as variáveis de resposta experimental ( $Y$ , concentração de surfactina em 48 h de cultivo) e predita pela equação ajustada ( $\hat{Y}$ ).

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para produção de surfactina foi de 0,99, indicando que 99% do total das variações nos níveis de produção de surfactina podem ser atribuídas às variáveis independentes e apenas 1% não pode ser explicado pelo modelo. Em outras palavras, a equação se ajustou bem aos dados experimentais. A análise de variância mostrou que os termos lineares e quadráticos foram significativos ( $p < 0,05$ ), sendo que a razão okara/bagaço apresentou maior efeito na produção da surfactina do que a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . No outro lado, a interação entre as variáveis apresentou um valor de  $p > 0,05$ , não sendo significativa para este modelo. Quando os níveis aumentaram de  $-1,41$  para  $+1,41$  na razão de okara/bagaço, pode-se observar um grande efeito negativo para a síntese da surfactina. Este fato sustenta a hipótese de que, o okara, como único substrato ou presente em maior concentração, pode ser um fator limitante, devido à forma compacta do leito que dificulta as trocas gasosas.

TABELA 13. DELINEAMENTO FATORIAL UTILIZADO PARA OTIMIZAR AS CONDIÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448.

Ensaio	Valores originais e codificados das variáveis independentes				Concentração de surfactina em 48 h (mg.L-SU <sup>-1</sup> )	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L-SU <sup>-1</sup> )	X <sub>1</sub>	Okara/bagaço (%m:%m)	X <sub>2</sub>	Observado (Y)	Esperado (Ŷ)
1	0,4	-1	29:71	- 1	279	296
2	1,2	+1	29:71	- 1	243	224
3	0,4	-1	71:29	+ 1	66	107
4	1,2	+1	71:29	+ 1	51	56
5	1,4	+1,41	50:50	0	170	185
6	0,2	-1,41	50:50	0	309	272
7	0,8	0	80:20	+ 1,41	22	- 5
8	0,8	0	20:80	- 1,41	241	247
9	0,8	0	50:50	0	807	811
10	0,8	0	50:50	0	820	811
11	0,8	0	50:50	0	806	811

A equação ajustada é dada por:

$$\hat{Y} = 811,2 - 30,8X_1 - 89,4X_2 - 293,2X_1^2 - 347,4X_2^2 + 5,4X_1X_2 \quad (4)$$

O modelo mostrou-se muito significativo, com um *p*-valor extremamente baixo e um *F*-calculado mais do que 36 vezes superior ao *F*-tabelado (Tabela 14). Assim, foi possível construir uma superfície de resposta que mostra a concentração máxima de surfactina de 811 mg.L-SU<sup>-1</sup>, obtida com 0,8 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> na solução umedecedora e com 50% de cada, bagaço de cana e okara (Figura 26).

TABELA 14. ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS OBTIDOS PELO DELINEAMENTO FATORIAL.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-calc	p-valor
Regressão	982748,7	5	196549,7	202,4	<0,000031
Resíduos	4855,2	5	971,0		
Total	977893,5	10			

$$F_{5;5;0,05} = 5,05$$

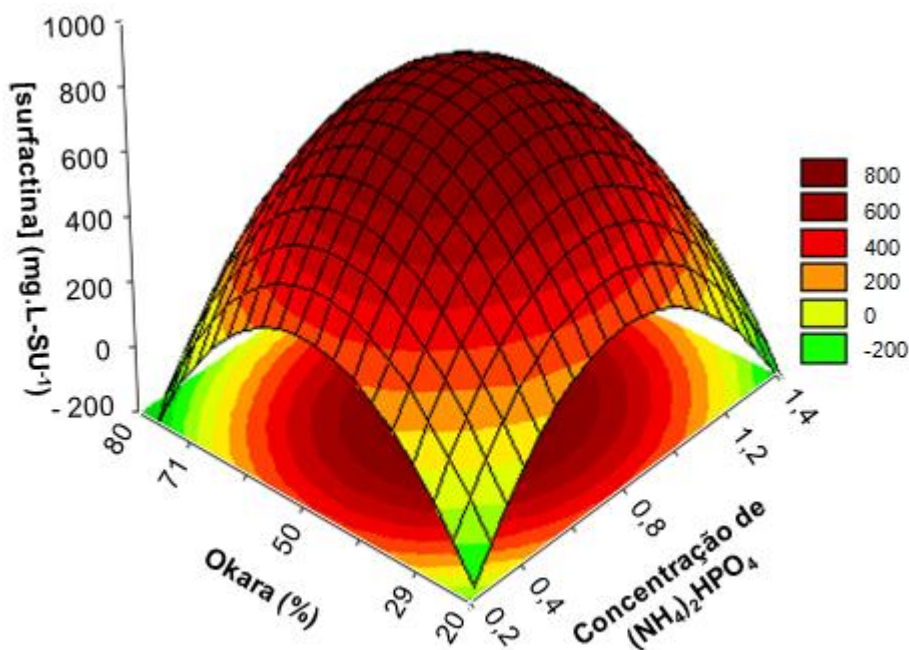


FIGURA 26. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. As variáveis independentes são a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na solução umedecedora e a quantidade relativa de okara e bagaço de cana (nesta figura utilizou-se os valores originais das variáveis). A variável resposta é a concentração de surfactina em 48 h de cultivo, expressa em base de volume de solução umedecedora utilizada (isto é, como  $\text{mg.L}^{-1}\text{-SU}$ ).

#### 5.4.6 Cinética de produção de surfactina em colunas de Raimbault nas condições otimizadas

A produção de surfactina em colunas de Raimbault, sob as condições ótimas identificadas no delineamento fatorial, foi conduzida por 72 h. A maior concentração de surfactina, de  $809 \text{ mg.L-SU}^{-1}$  em 48 h (Figura 27) é consistente com o resultado do experimento obtido pelo delineamento fatorial e é 1,3 vezes maior do que os  $646 \text{ mg.L-SU}^{-1}$ , obtidos em 48 h nos primeiros experimentos conduzidos no biorreator de colunas de Raimbault (Figura 24), com menor concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ( $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ ). Durante o cultivo a temperatura do leito permaneceu a  $37^\circ\text{C}$ , enquanto a umidade do leito aumentou de 74% para 85%.

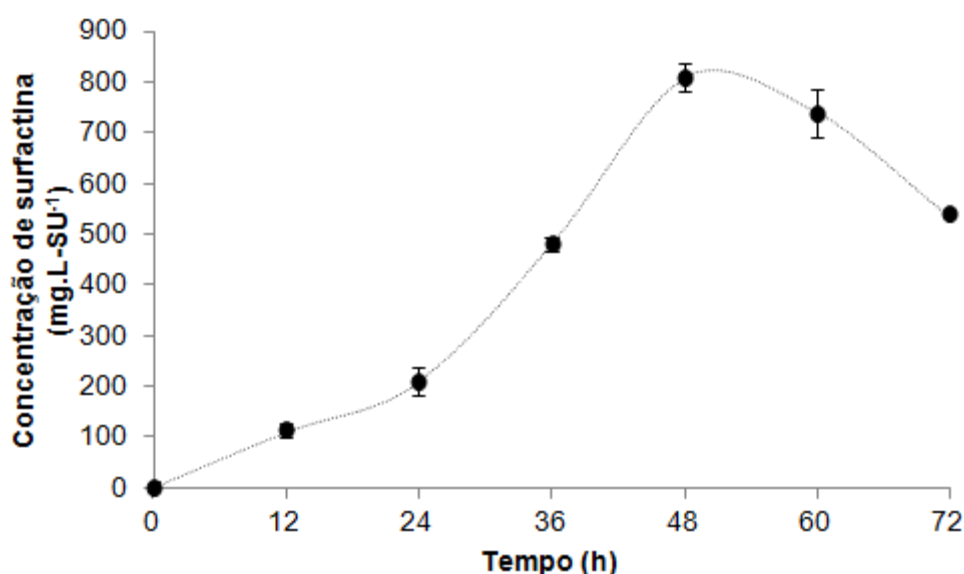


FIGURA 27. CINÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO SOB CONDIÇÕES OTIMIZADAS, USANDO COLUNAS DE RAIMBAULT. O meio de cultivo foi preparado com mistura 1:1 (m/m) de bagaço de cana e okara impregnados com a solução umedecedora contendo  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . O cultivo foi conduzido a  $37^\circ\text{C}$ , com um fluxo de ar ascendente de  $200 \text{ mL.min}^{-1}$  e pressão de  $0,9 \text{ atm}$ . Os valores plotados são as médias dos frascos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da média.

O uso do bagaço de cana como um *bulking agent* permitiu que fossem produzidos neste trabalho os maiores valores obtidos até o momento para a produção de surfactina em FES com uma cepa não recombinante. O melhor valor obtido, de  $809 \text{ mg.L-SU}^{-1}$ , corresponde a  $3,3 \text{ g.kg-SS}^{-1}$  (ou seja, gramas por quilo de sólido seco). Os únicos estudos anteriores de produção de surfactina em FES envolvem cepas de *Bacillus* cultivados com okara (OHNO; ANO; SHODA, 1995a, 1995b; BUGAY, 2009). O melhor nível obtido neste trabalho é superior ao valor de  $2,5 \text{ g.kg-SS}^{-1}$  obtidos por Ohno, Ano e Shoda (1995b) com uma cepa não recombinante (Tabela 15). No entanto, é inferior ao valor de  $2 \text{ g.kg-SU m}^{-1}$  obtidos por Ohno, Ano e Shoda (1995a) com uma cepa recombinante. Dado o seu teor de umidade de 82% (m/m, base úmida), isso é equivalente a  $10 \text{ g.kg-SS}^{-1}$ . O nível relatado no presente trabalho também é 10 vezes superior ao nível de  $357 \text{ mg.kg-SS}^{-1}$  obtido por Bugay (2009), usando a mesma cepa de *B. pumilus* utilizada neste estudo, com okara como substrato e espuma de poliuretano como *bulking agent*.

TABELA 15. RENDIMENTO DE LIPOPEPTÍDEOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus*

MICROORGANISMO	SUBSTRATO (quantidade utilizada)	LIPOPEPTÍDEO	CONCENTRAÇÃO	REFERÊNCIA
<i>B. pumilus</i> UFPEDA 448	okara + bagaço de cana (10 g-SS)	surfactina A	3,3 g.kg-SS <sup>-1</sup>	este trabalho
<i>B. subtilis</i> MI113(pC112)	okara (15 g-SS)	surfactina	10 g.kg-SS <sup>-1</sup>	Ohno, Ano e Shoda (1995a)
<i>B. subtilis</i> RB14	okara (15 g-SS)	surfactina e iturina A	2,5 g.kg-SS <sup>-1</sup> 6 g.kg-SS <sup>-1</sup>	Ohno, Ano e Shoda (1995b)
<i>B. pumilus</i> UFPEDA 448	okara + espuma de poliuretano (10 g-SS)	surfactina A	357 mg.kg-SS <sup>-1</sup>	Bugay (2009)
<i>B. subtilis</i> NB22	farelo de trigo (15 g-SS)	iturina A	3,6 g.kg-SS <sup>-1</sup>	Ohno, Ano e Shoda (1992)
<i>B. subtilis</i> NB22	okara (3 kg-SS)	iturina A	6 g.kg-SS <sup>-1</sup>	Ohno, Ano e Shoda (1993)
<i>B. subtilis</i> NB22	okara (15 g-SS)	iturina A	1 g.kg-SUm <sup>-1</sup> (83% de umidade)	Ohno, Takashi e Shoda (1996)
<i>B. subtilis</i> RB14 CS	okara (15 g-SS)	iturina A	14 g.kg-SS <sup>-1</sup>	Mizumoto, Hirai e Shoda (2006)
<i>B. subtilis</i> RB14 CS	okara (15 g-SS)	iturina A	5,6 g.kg-SUm <sup>-1</sup> (79% de umidade)	Mizumoto e Shoda (2007)
<i>B. subtilis</i> S3	farelo de trigo (10 g-SS) e farelo de arroz (50 g-SS)	iturina A	20,8 g.kg-SS <sup>-1</sup>	Shih <i>et al.</i> (2008)
<i>B. subtilis</i> RB14 CS	okara (2 kg-SUm)	iturina A	3,5 g.kg-SUm <sup>-1</sup> (% de umidade não citada)	Ano <i>et al.</i> (2009)
<i>B. subtilis</i> B6-1	resíduo de soja e batata doce (20 g-SS)	fengicina	não citado	Wang <i>et al.</i> (2008)
<i>B. subtilis</i> FE-2	farelo de trigo (5 g-SS) ou (500 g-SS)	não identificado	não citado (33% de redução da tensão superficial)	Veenanadig, Gowthaman e Karanth. (2000)
<i>B. subtilis</i> DM-03 e DM-04	casca de batata (5 g-SS)	não identificado	67 g.kg-SS <sup>-1</sup> *	Das e Mukherjee (2007)

\* isso não foi medido diretamente, mas estimado com base na determinação da concentração de proteínas.

O teor de umidade está calculado em base seca. SS – sólido seco, SUm – sólido úmido



Apesar dos bons resultados obtidos neste trabalho, experimentos em FS ainda apresentam valores bem maiores para a produção de surfactina: Wei, Lai e Chang (2007), Wei e Chu (1998) e Yeh, Wei e Chang (2005) relatam a produção de cerca de  $3,5 \text{ g.L}^{-1}$  de surfactina produzida pela cepa de *B. subtilis* ATCC 21332 cultivada em meio salino suplementado com glucose e Yeh, Wei e Chang (2006) obtiveram  $6,5 \text{ g.L}^{-1}$  em um biorreator com as razões de aeração e agitação do meio de cultivo otimizadas. Neste trabalho, através de FES foi alcançada uma produção de  $809 \text{ mg.L-SU}^{-1}$  de surfactina, cerca de 8 vezes menor, o que indica a necessidade de novos estudos que tornem a FES para a produção de lipopeptídeos competitiva em relação a FS.

#### 5.4.7 Obtenção de dados de respirometria

O presente trabalho apresenta pela primeira vez dados de respirometria obtidos durante a produção de biosurfactantes por FES (Figura 28). A importância disto é que a produção de calor metabólico durante crescimento aeróbico é diretamente proporcional à velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  (BAILEY; OLLIS, 1986). Desta maneira, a realização de um cultivo em escala laboratorial que permita a obtenção de dados de consumo de  $\text{O}_2$  pode ajudar a prever a intensidade de geração de calor em larga escala, utilizando ferramentas como a modelagem matemática. Este tipo de ferramenta pode ajudar a traçar estratégias que facilitem a transferência de massa e dissipação de calor.

O pico para o consumo de  $\text{O}_2$  ( $20 \text{ mmol.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  de sólido seco inicial) ocorreu em 48 h e corresponde ao pico de produção de surfactina. Estes dados mostram que a produção de surfactina está relacionada com um aumento na atividade respiratória do cultivo.

Os dados de respirometria sugerem que seja dada uma atenção especial na remoção de calor em processos de FES em larga escala para a produção de surfactina. Baseado em um fator de 520 kJ de calor metabólico produzido por mol de  $\text{O}_2$  consumido (BAILEY; OLLIS, 1986), a taxa máxima de captação de  $\text{O}_2$  de  $20 \text{ mmol.min}^{-1}.\text{kg-SS}^{-1}$  corresponde a uma taxa de produção de calor metabólico de  $182 \text{ W.kg-SS}^{-1}$  ou  $49 \text{ W.kg-SU}^{-1}$ . Os modelos matemáticos de biorreatores em FES sugerem que tais taxas de produção de calor apresentam grandes desafios para os sistemas de controle de temperatura, requerendo taxas de aeração muito mais

elevadas do que normalmente tem sido utilizadas em biorreatores de FES até o presente momento. Por exemplo, em um biorreator de leito agitado, com 1416,5 kg de sólido seco e aeração forçada, a 35 °C, mas sem sistema de resfriamento por leito encamisado, as taxas de produção de calor são da ordem de 20 a 30 W.kg-SUm<sup>-1</sup>. Estes valores permitem a previsão de elevação da temperatura do leito para cerca de 50 °C em uma taxa de aeração de 1 vvm (isto é, volume de ar por volume de biorreator por minuto) e 45 °C em uma taxa de aeração de 3 vvm (MITCHELL; KRIEGER, 2006). Na verdade, tais temperaturas elevadas foram observadas em pequena escala. Em um biorreator contendo 750 g de sólido seco e com aeração forçada, a 30 °C, Ghildyal *et al.* (1994) obtiveram temperaturas de pico de 52 °C a 0,8 vvm, 45,5 °C a 2,5 vvm e 35,5 °C a 4 vvm. Uma possibilidade em larga escala pode ser a utilização de biorreatores de bandeja do tipo koji ou modelos especiais de biorreatores que combinam a aeração forçada com a utilização de placas internas de transferência de calor, tais como os reatores Plafactor Zymotis e Prophtya (DURAND, 2003). No entanto, estes modelos podem ter uma complexidade mecânica significativamente maior e a manipulação do substrato pode ser bastante trabalhosa.

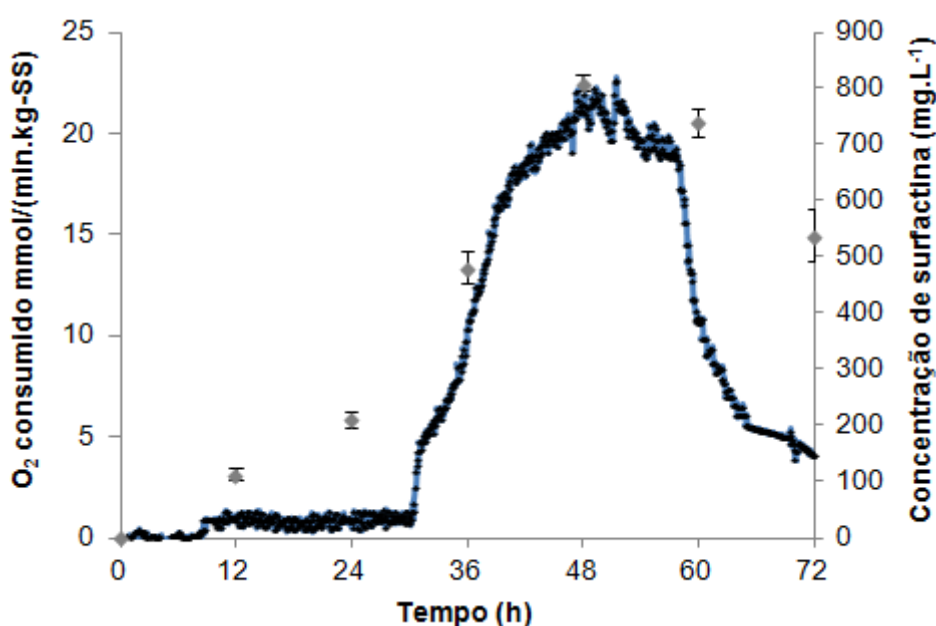


FIGURA 28. PERFIL DE RESPIROMETRIA DE *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 DURANTE A PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM COLUNAS DE RAIMBAULT. O cultivo foi conduzido a 37 °C, com um fluxo de ar ascendente de 200 mL.min<sup>-1</sup> e pressão de 0,9 atm.

O calor metabólico produzido durante o cultivo é um dos principais fatores responsáveis pelo superaquecimento do leito, o que pode ocorrer tanto no centro do biorreator quanto na sua porção final, na saída dos gases onde o ar já perdeu umidade. No entanto, devido ao pequeno diâmetro da coluna de Raimbault utilizada durante os experimentos (40 mm), a remoção de calor por condução pelas paredes da coluna até a água no banho foi suficiente para manter a temperatura em 37 °C durante todo o cultivo. Em biorreatores de diâmetros maiores, em escala piloto e industrial, apenas os fenômenos de condução não são capazes de realizar as trocas de calor com o meio e desta forma surge a necessidade de utilizar outras estratégias que permitam a manutenção da temperatura, como a aeração forçada e o emprego de um *bulking agent*, por exemplo.

## 5.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS EM LARGA ESCALA

Uma vez que o microrganismo utilizado neste trabalho não é recombinante, apresenta potencial para ser utilizado em um processo em larga escala, sem que seja necessária a utilização de protocolos especiais de segurança, diferente do que ocorre com a cepa recombinante usada por Ohno, Ano e Shoda (1995a). Vários autores têm iniciado estudos de ampliação de escala para a produção de lipopeptídeos por FES, utilizando biorreatores de leito fixo, contendo 1 ou 2 kg de okara úmido (ANO *et al.*, 2009), 500 g de farelo de trigo seco e umedecido com tampão fosfato (VEENANADIG; GOWTHAMAN; KARANTH, 2000) ou 3 kg de okara seco umedecido com solução de nutrientes (OHNO; ANO; SHODA, 1993) (Tabela 15, p. 94). No entanto, em larga escala, um leito contendo apenas okara ou farelo de trigo como substrato é inadequado, pois tende a formar uma massa compacta que impede o fluxo de ar através do leito e, portanto, restringe a transferência de gás e remoção de calor (OHNO; ANO; SHODA., 1993; ANO *et al.*, 2009). De fato, uma das considerações mais importantes no aumento de escala de um processo de FES é a remoção adequada do calor metabólico do leito.

A adição de um *bulking agent*, como o bagaço de cana utilizado no presente trabalho, fornece um leito com porosidade adequada, que favorece as trocas gasosas e a remoção de calor, especialmente nos biorreatores que têm aeração forçada. Em um meio preparado somente com okara, a porosidade (volume vazio

por volume total) foi de apenas 0,27, enquanto no meio com mistura de bagaço de cana e okara na proporção 5:5 (m/m), a porosidade foi de 0,62 (Tabela 16). Leitos com alta porosidade são desejáveis em larga escala, a fim de promover um fluxo de ar uniforme e evitar altas quedas de pressão (VEENANADIG; GOWTHAMAN; KARANTH, 2000). Também apresentam uma área interfacial maior, possibilitando a existência de mais espaço para a presença de um filme líquido diretamente relacionado com a transferência de oxigênio (GOWTHAMAN *et al.*, 1993).

TABELA 16. DETERMINAÇÃO DA POROSIDADE DO LEITO DE FERMENTAÇÃO EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE OKARA E BAGAÇO DE CANA.

SUBSTRATO (proporção, m/m)	POROSIDADE ( $\epsilon$ )
okara + bagaço de cana (10:0)	0,27
okara + bagaço de cana (8:2)	0,42
okara + bagaço de cana (7,5:2,5)	0,5
okara + bagaço de cana (7:3)	0,53
okara + bagaço de cana (5:5)	0,62
okara + bagaço de cana (3:7)	0,67
okara + bagaço de cana (2,5:7,5)	0,7
okara + bagaço de cana (2:8)	0,74
okara + bagaço de cana (0:10)	0,78

Em alguns trabalhos relatados na literatura para a produção de iturina em FES usando apenas okara ou farelo de trigo como substrato, os autores mostraram que, em escalas maiores, a temperatura no interior do leito pode ser controlada pelo aumento da vazão de aeração de 10 para 20 L.min<sup>-1</sup>, impedindo perda de produtividade (OHNO; ANO; SHODA, 1993; VEENANADIG; GOWTHAMAN; KARANTH, 2000; ANO *et al.*, 2009). Veenanadig, Gowthaman e Karanth (2000) afirmam que um maior fluxo de ar pode superar a resistência ao transporte e fornecimento de oxigênio necessário para a biomassa.

## 5.6 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES TENSOATIVAS DA SURFACTINA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

### 5.6.1 Determinação da concentração micelar crítica

A concentração micelar crítica (CMC) é um importante parâmetro para avaliação da eficiência de um surfactante. Quanto mais eficiente for o surfactante,

menor a CMC. A CMC da surfactina produzida pela cepa de *B. pumilus* UFPEDA 448 por FES em colunas de Raimbault foi determinada em função da medida da TS ( $\text{mN.m}^{-1}$ ) de diluições sucessivas de solução aquosa do extrato orgânico (item 4.5.1, Materiais e Métodos, p. 60). Foi então construído um gráfico, plotando-se a TS medida contra a concentração da surfactina, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. A CMC determinada foi de  $12,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , em uma TS de  $27 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figura 29). O valor é próximo aos valores encontrados por vários autores que produziram surfactina em FS usando cepas de *B. subtilis*:  $11 \text{ mg.L}^{-1}$  (NITSCHKE *et al.*, 2004; BARROS; PONEZI; PASTORE, 2008);  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  (DELEU *et al.*, 1999) e  $14 \text{ mg.L}^{-1}$  (SHEPPARD; MULLIGAN, 1987). Foi importante verificar estes dados, pois o método de fermentação pode afetar significativamente as proporções dos diferentes homólogos produzidos, com conseqüentes diferenças nas propriedades tensoativas.

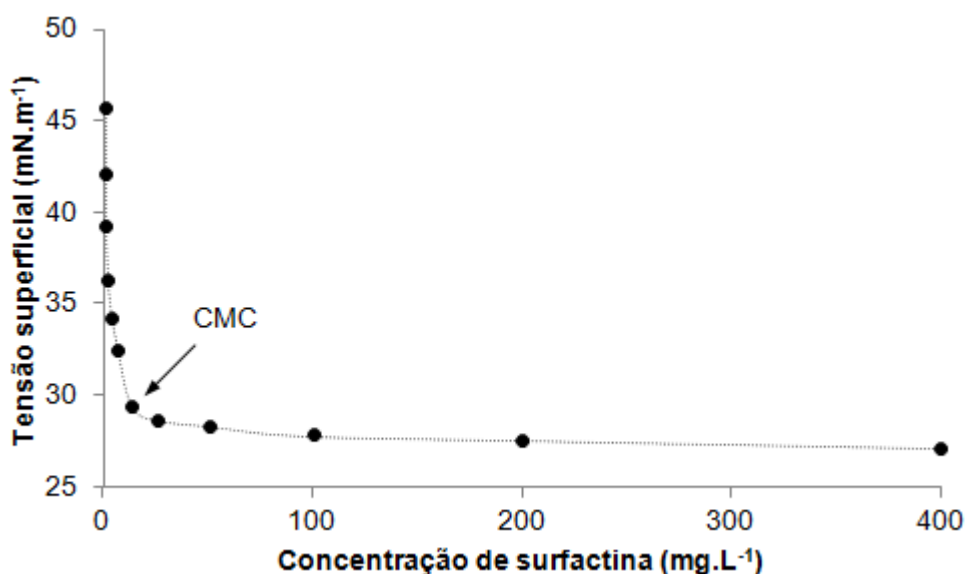


FIGURA 28. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA A PARTIR DE DILUIÇÕES SERIAIS DE SOLUÇÃO AQUOSA DE SURFACTINA PRODUZIDA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM COLUNAS DE RAIMBAULT.

#### 5.6.2 Efeito do tratamento térmico nas propriedades tensoativas da surfactina

Diversos setores onde são sugeridas as aplicações para biosurfactantes trabalham em condições elevadas de temperatura e pressão, como observado na indústria de alimentos, por exemplo, (NITSCHKE; COSTA, 2007). Assim, estes compostos necessitam certa estabilidade a variações de temperatura e, desta forma, assegurar a eficácia de suas propriedades tensoativas.

Com o intuito de verificar se um tratamento térmico provocaria a decomposição da surfactina de *B. pumilus* com conseqüente perda das propriedades tensoativas, uma solução aquosa ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), obtida a partir do extrato orgânico, foi submetida a diferentes tratamentos térmicos (20, 40, 60 e 120 min a  $100^\circ\text{C}$  e  $121^\circ\text{C}$ ). Os resultados obtidos indicaram que as TS destas soluções não foram afetadas. Quando as amostras foram submetidas a  $100^\circ\text{C}$  e  $121^\circ\text{C}$  (Tabela 17), os valores de TS permaneceram em torno de  $28 \text{ mN.m}^{-1}$ . Os valores de TS em  $\text{DMC}^{-1}$  e  $\text{DMC}^{-2}$  (diluições 1:10 e 1:100 da solução a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  do biosurfactante em estudo) também foram constantes em torno de  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . A solução aquosa de surfactina que ficou armazenada a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), também não sofreu alteração em relação a capacidade de redução da TS, após 120 dias, foram obtidos os mesmos resultados para a TS e CMC apresentados na Figura 28.

Tabela 17. DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL DA SURFACTINA SUBMETIDA AO TRATAMENTO TÉRMICO.

TEMPO (min)	TENSÃO SUPERFICIAL ( $\text{mN.m}^{-1}$ )					
	$100^\circ\text{C}$			$121^\circ\text{C}$		
	TS	$\text{DMC}^{-1}$	$\text{DMC}^{-2}$	TS	$\text{DMC}^{-1}$	$\text{DMC}^{-2}$
0	$27,1 \pm 0,6$	$28,4 \pm 0,2$	$30,4 \pm 0,1$	$27,1 \pm 0,6$	$28,4 \pm 0,2$	$30,4 \pm 0,1$
20	$27,3 \pm 0,4$	$28,6 \pm 0,8$	$29,7 \pm 0,1$	$27,9 \pm 1,0$	$29,2 \pm 0,4$	$30,8 \pm 0,6$
40	$28,0 \pm 0,6$	$29,0 \pm 0,1$	$29,9 \pm 0,4$	$28,3 \pm 0,3$	$29,0 \pm 0,1$	$30,5 \pm 0,3$
60	$28,0 \pm 0,4$	$29,9 \pm 0,1$	$30,4 \pm 0,2$	$28,4 \pm 0,5$	$29,6 \pm 0,1$	$30,9 \pm 0,1$
120	$27,8 \pm 0,2$	$30,1 \pm 0,1$	$31,0 \pm 0,2$	$28,7 \pm 0,2$	$29,7 \pm 0,3$	$31,5 \pm 0,3$

Legenda: TS (tensão superficial de uma solução aquosa de surfactina  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ );  $\text{DMC}^{-1}$  (diluição 1:10 da solução aquosa  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ );  $\text{DMC}^{-2}$  (diluição 1:100 da solução aquosa  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Os valores plotados são as médias dos experimentos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da amostra.

### 5.6.3 Efeito da força iônica nas propriedades tensoativas da surfactina

A surfactina produzida neste estudo por FES manteve suas propriedades tensoativas em todas as concentrações salinas estudadas. Não foi observada nenhuma diferença entre as duas concentrações de surfactina utilizadas ( $1$  e  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), sendo que todos os valores nas medidas de TS e DMC foram constantes em torno de  $28$  e  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 18).

Cabe ressaltar que quando foi testada a concentração de surfactina de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , em  $\text{DMC}^{-2}$  a concentração da surfactina diminui  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Esta concentração está próxima ou abaixo da CMC, o que faz com que qualquer alteração de concentração afete de forma significativa a TS. O fato de não ter sido

observada alteração significativa no valor de TS nesta concentração, indica que a surfactina não sofreu nenhuma desestabilização de suas micelas mostrando-se resistente a presença de NaCl.

TABELA 18. DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL DA SURFACTINA SUBMETIDA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO.

Na Cl % (m/v)	TENSÃO SUPERFICIAL (mN.m <sup>-1</sup> )					
	1,0 mg.mL <sup>-1</sup> de surfactina			2,5 mg.mL <sup>-1</sup> de surfactina		
	TS	DMC <sup>-1</sup>	DMC <sup>-2</sup>	TS	DMC <sup>-1</sup>	DMC <sup>-2</sup>
0	27,1 ± 0,3	28,4 ± 0,1	30,4 ± 0,5	27,2 ± 0,5	28,1 ± 0,6	29,9 ± 0,5
2,5	27,9 ± 0,4	28,3 ± 0,5	30,1 ± 0,3	27,7 ± 0,3	28,7 ± 0,4	30,4 ± 0,4
5	27,7 ± 0,2	28,4 ± 0,3	29,9 ± 0,2	28,1 ± 0,3	29,1 ± 0,5	30,2 ± 0,2
10	28,1 ± 0,4	29,2 ± 0,2	30,3 ± 0,4	27,9 ± 0,2	28,9 ± 0,1	30,5 ± 0,3
20	27,6 ± 0,2	28,7 ± 0,4	29,9 ± 0,5	28,3 ± 0,4	29,0 ± 0,3	30,7 ± 0,3

Legenda: TS (tensão superficial de uma solução aquosa de surfactina 1 mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>); DMC<sup>-1</sup> (diluição 1:10 da solução aquosa 1 mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>); DMC<sup>-2</sup> (diluição 1:100 da solução aquosa 1 mg.mL<sup>-1</sup> e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Os valores plotados são as médias dos experimentos em triplicata ± o erro padrão da amostra.

Processos de biorremediação com o emprego de surfactantes frequentemente envolvem ambientes salinos, como por exemplo, na recuperação de derramamento de petróleo em ambientes marinhos, ou até mesmo na recuperação melhorada de petróleo, onde a concentração salina encontra-se por volta de 3,5% (m/v), onde 50% corresponde ao cloreto de sódio (NaCl). Assim, é desejável que os surfactantes sejam estáveis nestas condições. Os biosurfactantes normalmente apresentam-se ativos em concentrações de 10% de NaCl, enquanto que concentrações salinas de 2 a 3% são suficientes para fazer com que surfactantes convencionais, que normalmente possuem a porção hidrofílica ionizada, não consigam formar micelas, perdendo sua função (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Neste sentido, a estabilidade das micelas formadas pelo lipopeptídeo produzido neste estudo em uma concentração de 20% de NaCl é um excelente resultado. Valores semelhantes foram obtidos por Barros, Ponezi e Pastore (2008) quando determinaram as propriedades emulsificantes e estabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira.

#### 5.6.4 Efeito do pH nas propriedades tensoativas da surfactina

Frente a variações de pH, observa-se uma variação maior nos valores de TS da surfactina do que nos estudos feitos com temperatura e força iônica (Tabela 19).

Em pH próximo da neutralidade (entre 6 e 8) não há variação significativa nos valores da TS,  $DMC^{-1}$  e  $DMC^{-2}$  ( $28 \text{ mN.m}^{-1}$ ,  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  e  $32 \text{ mN.m}^{-1}$ , respectivamente). Porém, nas faixas de pH ácido e básico verifica-se que os valores de TS, tanto da solução a  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  do biosurfactante quanto das suas diluições ( $DMC^{-1}$  e  $DMC^{-2}$ ), apresentaram um aumento gradativo. Na primeira diluição,  $DMC^{-1}$  (concentração de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), a concentração da surfactina em solução ainda encontrava-se superior à CMC. Nesta situação, observaram-se aumentos nos valores de tensão superficial da ordem de 9% para os experimentos conduzidos em pH 2, 4, 10 e 12 em relação à solução em pH 7. Indicando que o efeito da variação de pH nas propriedades tensoativas do biosurfactante é pequeno.

TABELA 19. DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL DA SURFACTINA SUBMETIDA À VARIAÇÃO DE pH.

pH	TENSÃO SUPERFICIAL ( $\text{mN.m}^{-1}$ )		
	TS	$DMC^{-1}$	$DMC^{-2}$
2	$33,7 \pm 0,7$	$37,1 \pm 0,6$	$54,2 \pm 1,2$
4	$31,6 \pm 0,8$	$34,9 \pm 0,9$	$50,3 \pm 0,8$
6	$27,8 \pm 0,4$	$29,7 \pm 0,5$	$32,4 \pm 0,6$
8	$27,7 \pm 0,7$	$30,2 \pm 0,8$	$31,9 \pm 0,9$
10	$28,9 \pm 0,8$	$30,8 \pm 0,7$	$37,2 \pm 1,0$
12	$32,3 \pm 0,5$	$36,4 \pm 0,9$	$46,8 \pm 1,1$

Legenda: TS (tensão superficial de uma solução aquosa de surfactina  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ );  $DMC^{-1}$  (diluição 1:10 da solução aquosa  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ );  $DMC^{-2}$  (diluição 1:100 da solução aquosa  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Os valores plotados são as médias dos experimentos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da amostra.

Entretanto, na segunda diluição,  $DMC^{-2}$  (concentração de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), a concentração de surfactina encontrava-se no limite do valor da concentração micelar crítica. Esta diluição foi escolhida justamente para verificar se os tratamentos testados causariam alguma alteração, mesmo que pequena, nas propriedades funcionais do biosurfactante, uma vez que concentrações abaixo do valor da CMC causam grandes aumentos no valor da TS. Assim, verifica-se que, quando o biosurfactante em  $DMC^{-2}$  teve o seu pH ajustado de 7 para 2 e 4, ocorreu um aumento da ordem de 38% e 37%, respectivamente, no valor de tensão superficial e em pH 10 e 12 o aumento foi de 22% e 31%, respectivamente. Cooper *et al.* (1981) e Kim *et al.* (1997) já haviam observado em seus experimentos que a precipitação da surfactina pela acidificação do meio eleva os valores da TS e comentam que isto deve ocorrer também para a alcalinização. Quando neutralizadas novamente, tanto as amostras em pH ácido quanto alcalino mostram uma redução da TS para níveis



semelhantes aos encontrados antes da acidificação ou alcalinização. Esta característica representa uma vantagem adicional do biosurfactante estudado, pois mesmo quando submetido a condições mais extremas de pH, onde sofre protonação/desprotonação de grupos, suas propriedades funcionais são recuperadas quando retornam ao pH original (BARROS; PONEZI; PASTORE, 2008).

#### 5.6.5 Propriedade emulsificante

Uma vez que uma das principais propriedades dos biosurfactantes é a sua capacidade de formar emulsões, o  $E_{24}$  foi testado com diferentes hidrocarbonetos e óleos vegetais. A surfactina produzida neste trabalho apresenta valores de  $E_{24}$  acima de 50% para a maioria dos óleos testados (Figura 30). Resultados semelhantes foram obtidos por Costa (2005), que estudou um lipopeptídeo produzido por uma linhagem de *B. subtilis*. Nestes experimentos foi utilizada solução de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  do produto bruto em água, que apresentou capacidade de formar emulsões estáveis de óleos comestíveis, por exemplo, óleos de buriti, maracujá, cupuaçu, babaçu, linhaça, castanha do Pará, palma, soja, girassol, canola e oliva. Estes resultados demonstram um potencial uso de lipopeptídeos na indústria de alimentos, que faz uso de emulsificantes em diversos processos.

Com relação aos hidrocarbonetos, a surfactina apresentou bons resultados apenas com tolueno e gasolina (53 e 55%, respectivamente), e não formou emulsão com diesel e querosene. O melhor resultado foi obtido com óleo de motor (83%), próximo ao valor obtido por Cameotra e Makkar (1998), que estudaram as propriedades da surfactina produzida por *B. subtilis* MTCC2423 em FS (Tabela 20).

A surfactina produzida em FES tem propriedades tensoativas semelhantes às já relatadas para a surfactina produzida em FS. Foi importante realizar esta verificação, pois é bem possível que o método de fermentação pudesse afetar significativamente as propriedades dos diferentes homólogos produzidos, com consequentes diferenças nas propriedades tensoativas.

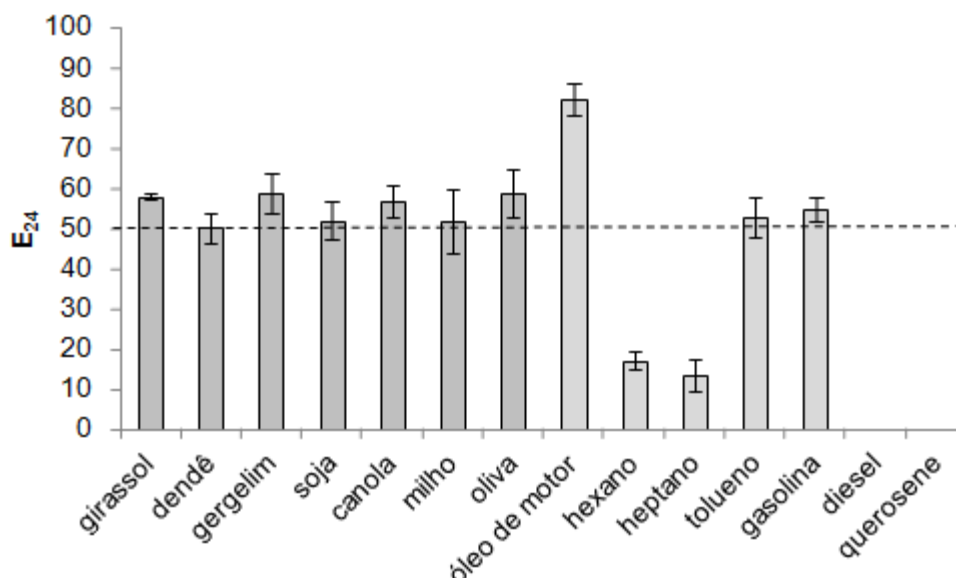


FIGURA 30. ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO ( $E_{24}$ )% FRENTE A DIFERENTES HIDROCARBONETOS E ÓLEOS VEGETAIS DA SOLUÇÃO AQUOSA DA SURFACTINA PRODUZIDA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO. Legenda: (■) óleos vegetais comestíveis; (□) derivados do petróleo. Os valores plotados são as médias dos experimentos em triplicata  $\pm$  o erro padrão da amostra

TABELA 20. PROPRIEDADES TENSOATIVAS DE LIPOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR CEPAS DE *Bacillus*.

MICROORGANISMO	$E_{24}$	TENSÃO SUPERFICIAL (mN.m <sup>-1</sup> )	CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (mg.L <sup>-1</sup> )	REFERÊNCIA
<i>B. pumilus</i> UFPEDA 448	82% óleo de motor	27	12.2	neste trabalho
<i>B. subtilis</i> MTCC2423	90% óleo de motor	28	35a	Cameotra e Makkar (1998)
<i>B. subtilis</i> MTCC1427	33% óleo de motor	32	40a	Cameotra e Makkar (1998)
<i>B. subtilis</i> PTCC1696	64% ciclohexano	27	10	Deleu <i>et al.</i> (1999)

## 6 CONCLUSÕES

A cepa SALPETRO 2D foi isolada de solo contaminado com água de produção de petróleo e identificada como *Bacillus* sp. Porém, apesar do microrganismo crescer em ambiente halofílico, a produção de biosurfactante só foi identificada na ausência de sal. A cepa de *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 apresentou maior potencial para a produção de biosurfactantes do que SALPETRO 2D em FES e foi selecionada para a continuidade do trabalho.

O okara foi selecionado como o melhor substrato para a produção de surfactina juntamente com o bagaço de cana como *bulking agent*. A mistura na proporção 1:1 resultou na produção de 5 homólogos da surfactina. A presença de um *bulking agent* juntamente com o substrato em FES ajudou a diminuir a compactação do leito de fermentação, facilitando a transferência de calor e massa.

O tratamento do okara com protease elevou os níveis de surfactina em FS cerca de três vezes, porém, não causou variação significativa no rendimento em FES. Esta diferença provavelmente deve ser atribuída ao fato de que em FES ocorre maior produção de protease (442 U.mL<sup>-1</sup>-SU, para o okara não hidrolisado) do que em FS (38 U.mL<sup>-1</sup>-SU, para o okara não hidrolisado). Portanto, o okara é um bom substrato pra a produção de surfactina, sendo desnecessária sua hidrólise prévia em FES.

A maior produção de surfactina ocorreu em temperatura ótima de 37 °C e em 60 h de cultivo. A temperatura de cultivo afeta a proporção relativa dos 5 homólogos da surfactina, sendo que a diferença mais acentuada foi observada a 45 °C com o desaparecimento dos homólogos C<sub>14</sub> e C<sub>16</sub>. O homólogo C<sub>15</sub> foi o homólogo mais abundante.

A concentração máxima de surfactina de 809 mg.L-SU<sup>-1</sup> ou 3,3 g.kg-SS<sup>-1</sup> foi obtida com 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> na solução umedecedora e com 50% de cada, bagaço de cana e okara após ensaios de otimização. Esta é a maior concentração de surfactina produzida por FES já relatada na literatura utilizando uma cepa de microrganismo não recombinante, *Bacillus pumilus* UFPEDA 448.

A utilização do biorreator de colunas com aeração forçada de 200 mL.min<sup>-1</sup>, permitiu a coleta de dados de respirometria, com um consumo máximo de O<sub>2</sub> de 20 mmol.min<sup>-1</sup>.kg-SS<sup>-1</sup>, e uma estimativa de produção de calor metabólico de 182 W.kg-SS<sup>-1</sup> ou 49 W.kg-SUm<sup>-1</sup>. A velocidade de consumo de O<sub>2</sub> por massa de

substrato seco indica que será um grande desafio manter a temperatura do leito em larga escala. Esta é a primeira vez que dados de respirometria são obtidos para a produção de lipopeptídeos por FES.

As propriedades tensoativas da surfactina produzida por FES em bagaço de cana e okara (CMC  $12,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $E_{24}$  superior a 50% para diversos hidrocarbonetos e óleos vegetais e 83% para óleo de motor) são muito semelhantes às obtidas para a surfactina relatada na literatura produzida por FS. A surfactina também manteve sua atividade tensoativa em temperatura alta ( $121^\circ\text{C}$  por 60 min), em elevadas forças iônicas (até 20% de NaCl) e na faixa de pH de 6 a 8. Foi importante verificar estes dados, pois a mudança de método de fermentação pode afetar significativamente as proporções dos diferentes homólogos produzidos, com conseqüentes diferenças nas propriedades tensoativas.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estudos de produção de surfactina por FES pela cepa de *Bacillus pumilus* UFPEDA 448, utilizando okara e bagaço de cana como substrato, permitiram identificar pontos a serem explorados em futuros trabalhos, tais como:

- Aprofundar os estudos relacionados à hidrólise de okara com o objetivo de alcançar maior grau de hidrólise. Embora tenha sido concluído neste trabalho que o uso de okara hidrolisado não representou diferença significativa para a produção de surfactina em FES quando comparado com o uso de okara não hidrolisado, os resultados obtidos com peptona de soja mostram que o uso de aminoácidos livres no meio de cultivo tanto em FS quanto em FES aumentam os níveis de surfactina produzida. Desta forma, se for possível alcançar grau de hidrólise para o okara semelhante ao da peptona de soja (DH = 58%) a sua pré-hidrólise pode ser importante para elevar os níveis de surfactina produzida também em FES.
- Utilizar ferramentas de modelagem matemática que permitam traçar estratégias eficazes para ampliação de escala, utilizando os dados de respirometria e otimização das condições de fermentação em biorreator de colunas de Raimbault. Neste contexto, há em nosso grupo de pesquisa um biorreator piloto (capacidade para 100 kg de substrato), que foi projetado utilizando dados obtidos a partir de modelos matemáticos de biorreatores de FES. O modelo matemático de Von Meien e Mitchell (2002), que descreve os fenômenos de transferência de massa e calor neste tipo de biorreator, atua como ferramenta para guiar a otimização da operação do biorreator. O modelo matemático pode prever como a vazão, a umidade e a temperatura do ar injetado irão afetar, em função do tempo e da posição, a temperatura e a umidade dentro do leito do substrato. Adicionalmente fornece informações de como a temperatura e a umidade do leito irão afetar o crescimento microbiano e formação do produto (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003). Assim, formulações de estratégia de ampliação de escala de biorreatores de FES (MITCHELL *et al.*, 1999) somam-se ao progresso do desenvolvimento de modelos matemáticos de crescimento microbiano em FES (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003; MITCHELL *et al.*, 2004) para possibilitar o desenvolvimento de

processos industriais baseados nessa tecnologia (LENZ *et al.*, 2004; HÖLKER; LENZ, 2005).

- Concluir os estudos de caracterização estrutural e molecular da surfactina produzida por *Bacillus pumilus* com respeito ao tipo de ácido graxo presente em cada um dos homólogos (*n*, *iso* ou *anteiso*). Estas análises podem ser feitas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), transformando o ácido graxo em ésteres metílicos acetilados e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (MONTEIRO *et al.*, 2007). O conhecimento detalhado da cadeia do ácido graxo presente em cada um dos homólogos pode ajudar a esclarecer o mecanismo utilizado pelo microrganismo para sua síntese. Este conhecimento pode ser utilizado para auxiliar a compreensão dos motivos que levam a síntese de proporções diferentes de homólogos em diferentes temperaturas.

- Estudar a possível separação e purificação dos homólogos de surfactina. Como observado neste trabalho, a temperatura de cultivo afeta a proporção dos homólogos produzidos e com isto levanta uma nova questão. As propriedades de atividade da surfactina são decorrentes da concentração total do composto (soma das concentrações dos homólogos) ou estas propriedades são derivadas majoritariamente de um dos homólogos?

- Testar a ação antimicrobiana e as propriedades tensoativas dos homólogos de surfactina isolados e purificados e compará-las a uma mistura de homólogos. Uma vez que se tenha isolado os homólogos da surfactina, necessita-se avaliar as propriedades ativas de cada um deles. Já é bem conhecido na literatura o potencial antimicrobiano da surfactina e também suas propriedades tensoativas, mas em sua mistura de homólogos. Se for comprovado que estas propriedades são derivadas de um tipo de homólogo em especial, as técnicas utilizadas para a produção da surfactina podem direcionar as condições de produção que favoreçam a síntese deste homólogo. Principalmente com relação ao controle da temperatura de cultivo.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWAF, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, ed. 3, p. 305-325, 2008.
- AL-AJLANI, M.M.; SHEIKH, M.A.; AHMAD, Z.; HASNAIN, S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 17, 2007.
- ANO, T.; JIN, G.Y.; MIZUMOTO, S.; RAHMAN, M.S.; OKUNO, K.; SHODA, M. Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. **Journal of Environmental Sciences Supplement**, p. S102-S165, 2009.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, p. 488-494, 1968.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2. ed., New York: McGraw-Hill, 1986.
- BANAT, I.M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal – review. **Acta Biotechnologica**, v. 15, p. 251-267, 1995.
- BANAT, I.M.; MAKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.
- BARROS, F.F.C.; PONEZI, A.N.; PASTORE, G.M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilote scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1071-1078, 2008.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BERTSCH, L.L.; BONSEN, P.P.M.; KOMBERG, A. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. XIV, phospholipids in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, v.98, p. 75-81, 1969.
- BESSON, F.; MICHEL, G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: evidence for amino acid activating enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 1013-1018, 1992.
- BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. p.1234.
- BOGNOLO, G. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.
- BORDOLOI, N.K.; KONWAR, B.K. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 495-505, 2009.
- BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.
- BUMPUS, S.B.; EVANS, B.S.; THOMAS, P.M.; NTAI, I.; KELLEHER, N.L. A proteomics approach to discovering natural products and their biosynthetic pathways. **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 951–956, 2009.

- BUSHNELL, L.D.; HASS, H.F. The utilization of certain hydrocarbon by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, p. 653–658, 1941.
- CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. **Journal of Biotechnology**, v. 109, ed. 3, p. 255-262, 2004.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, p. 97-116, 2010.
- CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 441-448, 2008.
- CAMILIOS NETO, D.; BUGAY, C.; SANTANA-FILHO, A.P.; JOSLIN, T.; SOUZA, L.M.; SASSAKI, G.L.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1395-1403, 2011.
- CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA, J.R.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, M.R. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501-105, 1947.
- CHO, K.M.; MATH, R.K.; HONG, S.Y.; ISLAM, S.M.S.; MANDANNA, D.K.; CHO, J.J.; YUN, M.G.; KIM, J.M.; YUN, H.D. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. **Food Control**, v. 20, p. 402-406, 2009.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in fuel studies of soil remediation. **Journal Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.
- COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408–412, 1981.
- COOPER D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environment of Microbiology**, v.53, p.224-229, 1987.
- COSMINA, P.; RODRIGUEZ, F.; DE FERRA, F.; GRANDI, G.; PEREGO, M.; VENEMA, G.; VAN SINDEREN, D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 8, p. 821-831, 1993.
- COSTA, G.A.N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial: caracterização e aplicações**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005.
- COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIEIROS J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian nature oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.
- COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry-a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.



DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry** v. 42, p. 1191-1199, 2007.

DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H. ; POPINEAU, Y. ; JACQUES, P. ; THONART, P. ; PAQUOT, P. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, ed. 1-2, p. 3-10, 1999.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DILLON, J.K.; FUERST, J.A.; HAYWARD, A.C.; DAVIS, G.H.G. A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, p. 13-19, 1986.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113-125, 2003.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa soja**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acesso em: 03 de dezembro de 2011.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208-217, 1992.

FRANCY, D.S.; THOMAS, J.M.; RAYMOND, R.L.; WARD, C.H. Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. **Industrial Microbiology**. v. 8, p. 237-246, 1991.

GHILDYAL, N.P.; GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; KARANTH, N.G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: effect of temperature gradients. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 253-257, 1994.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A.K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 172-176, 2008.

GOWTHAMAN, M.K.; GHILDYAL, N.P.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; KARANTH, N.G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid state fermenters: the effect of gaseous concentration gradients. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 56, p. 233-239, 1993.

GRAM, C. Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpräparaten. **Fortschritte der Medizin**, v. 2, p. 185-189, 1884.

HABBA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HAERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H.-P. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 33, p. 53-93, 2003.

HATHOUT, Y.; RYZHOV, V.; DEMIREV, P.; FENSELAU, C. Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1492-1496, 2000.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, p. 148-159, 2001.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

HUNG, N.D.; VAS, M.; CSEKE, E.; SZABOLSCI, G. Relative tryptic digestion rates of food proteins. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1535-1542, 1984.

JACQUES, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (Editor) **Biosurfactants**, v. 20. Springer-Verlag: Berlin, 2011, p. 57-91.

JOSHI, S.; YADAV, S.; DESAI, A.J. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 122-127, 2008.

KAKINUMA, A.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, p. 973-976, 1969.

KANEDA, T. Positional preference of fatty acids in phospholipids of *Bacillus cereus* and its relation to growth temperature. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 280, p. 297-305, 1972.

KANEDA, T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. **Bacteriological Reviews**, v. 41, p. 391-418, 1977.

KIM, K.; JUNG, S.Y.; LEE, D.K.; JUNG, J.-K.; PARK, J.K.; KIM, D.K.; LEE, C.-H. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 975-985, 1998.

KIM, S.-H.; YOON, B.-D.; LEE, C.-H.; SUH, H.-H.; OH, H.-M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 41-46, 1997.

KIM, S.-H.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, C.-H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253, 2000.

KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC21332. **Febs Letters**, v. 231, p. 107-110, 1988.

KRAAS, F.I.; HELMETAG, V.; WITTMANN, M.; STRIEKER, M.; MARAHIEL, M.A. Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 872-880, 2010.

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: SEN, R. (Editor) **Biosurfactants: advances in experimental medicine and biology**. 1. ed., v. 672. New York: Springer Science, 2010. Cap. 15, p. 203-210.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems – an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

KRÜSS. Processor Tensiometer K12. Hamburg, 1994. Manual.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

LAZAZZERA, B.A.; SOLOMON, J.M.; GROSSMAN, A.D. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *Bacillus subtilis*. **Cell**, v. 89, p. 917-925, 1997.

LEE, B.-S. & KIM, E.-K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 639-647, 2004.

LEE, S.C.; KIM, S.H.; PARK, I.H.; CHUNG, S.Y.; CHOI, Y.L. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. **Archives of Microbiology**, v. 188, p. 307-312, 2007.

LENZ, J.; HÖFER, M.; KRASENBRINK, J.B.; HÖLKER, U. Computational and physical methods in solid-state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 9-17, 2004.

LIMA, A.S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica***. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) –Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1997.

LIN, S.C.; GOURSAUD, J.C.; KRAMER, P.J.; GEORGIOU, G.; SHARMA, M.M. Production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. In: DONALDSON, E.C. (Editor). **Microbial enhancement of oil recovery – recent advances**, Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1990.

LIN, S.C.; MINTON, M.A.; SHARMA, M.M.; GEORGIOU, G. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 31-38, 1994.

LIU, X.Y.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Isolation and characterization of a C-12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. **Journal of Peptide Science**, v. 14, p. 864-875, 2008.

MAGNUSON, R.; SOLOMON, J.; GROSSMAN, A.D. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. **Cell**, v. 77, p. 207-216, 1994.

MAIER, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-116, 2003;

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 37-42, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683, 2005.

MENKHAUS, M.; ULLRICH, C.; KLUGE, B.; VATER, J.; VOLLENBROICH, D.; KEMP, R.M. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 7678-7684, 1993.

MITCHELL, D.A.; PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 167-178, 1999.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of Solid State Bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002a.

MITCHELL, D.A.; TONGTA, A.; STUART, D.M.; KRIEGER, N. The potential for establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentation in rotating drum bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, n. 1, p. 114-122, 2002b.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F.D.H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 1, p. 15-26, 2004.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor step of SSF: a complex interaction of phenomena**. Springer: Heidelberg, 2006, p.13-32.

MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. A model of a well-mixed SSF bioreactor. In: MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEVORIC editors. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. Springer: Heidelberg, 2006. p. 295-314.

MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 869-875, 2006.

MIZUMOTO, S.; SHODA, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 101-108, 2007.

MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G.L.; DE SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.

MOOTZ, H.D.; SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M.A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. **ChemBioChem**, v. 3, p. 490-504, 2002.

MORIKAWA, M.; ITO, M.; IMANAKA, T. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n. 5, p. 255-261, 1992.

MULLIGAN, C.N.; YONG, N.R.; GIBBS, F.B. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

MULLIGAN, C.N. Environmental application for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 372-378, 2009.

NAKANO, M.M.; ZUBER, P. Mutational analysis of the regulatory region of the *srfA* operon in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 3188-3191, 1993.

NARUSE, N.; TENMYO, O.; KOBARU, S.; KAMEI, H.; MIYAKI, T.; KONISHI, M.; OKI, T. Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics: production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. **Journal of Antibiotics**, v. 43, p. 267-280, 1990.

N'DIR, B.; HBID, C.; COMELIUS, C.; ROBLAIN, D.; JACQUES, P.; VANHENTENRYCK, F.; DIOP, M.; THONART, P. Propriétés antifongiques de la microflore du netetu. **Cahiers Agricultures**, v. 3, p. 23-30, 1994.

NISHIKIORI, T.; NAGANAWA, H.; MURAOKA, Y.; AOYAGI, T.; UMEZAW, H. Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-ff67: structural elucidation of plipastatins. **Journal of Antibiotics** (Tokyo), v. 39, p. 755-761, 1986.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; COSTA, G.N.; GILIOLI, R.; MEURER, E.C.; VICCARI GATTI, M.S.; EBERLIN, M.N.; HOEHR, N.F.; PASTORE, G.M. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 591-596, 2004.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONCAVES, L.A.G.; EBERLIN, M.; CONTIERO, J. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant 89 production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1562- 1566, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

OBERBREMER, A.; MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 485–489, 1990.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 817-822, 1992.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 23-27, 1993.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a Lipopeptide Antibiotic, Surfactin, by Recombinant *Bacillus subtilis* in Solid State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 209-214, 1995a.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-stage fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering** v. 80, p. 517-519, 1995b.

OHNO, A.; TAKASHI, A.; SHODA, M. Use of soybean curd residue, *okara*, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, Iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 801-806, 1996.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v. 9, ed. 4, p. 1084-1090, 2007.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 115-125, 2008.

OIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation productions systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 356-360, 2000.

O'TOOLE. Characteristics and use of *okara*, the soybean residue from soy milk production – a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 363-371, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D.A. New developments in solid state fermentation : I- bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.81-84, 2003.

PEYPOUX, F. Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v. 17, p. 3992–3996, 1978.

PEYPOUX, F.; BESSON, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. **European Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 323-327, 1981.

PEYPOUX, F.; MARION, D.; MAGET-DANA, R. Structure of bacillomycin F, a new peptidolipid antibiotic of the iturin group. **European Journal of Biochemistry**, v. 153, p. 335-340, 1985.

PEYPOUX, F.; POMMIER, M.T.; MARION, D.; PTAK, M.; DAS, B.C.; MICHEL, G. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Journal of Antibiotics**, v. 39, p. 636-641, 1986.

PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Controlle biosynthesis of Val<sup>7</sup>- and Leu<sup>7</sup>-surfactins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 36, p. 515-517, 1992.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Rapid identification of biosurfactant producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Technology**, v. 11, p. 671-674, 1997.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v.18, p. 1277-1281, 2002.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology Biotechnology**, v. 9, p. 199-209, 1980.

RAZA, Z.A.; REHMAN, A.; KHAN, M.S.; KHALID, Z.M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, v. 18, p. 115-121, 2007.

RODRIGUES, L.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 609-618, 2006.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326 p.

ROMERO, D.; VICENTE, A.; OLMOS, J.L.; DÁVILA, J.C.; PÉREZ-GARCÍA, A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 969-976, 2007.

ROSA, D.R. **Tratamento enzimático/biológico de efluente com alto teor de gordura**. 107f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, p. 29-33, 1980.

SAMSON, R.; CSEH, T.; HAWARI, J.; GREER, C.W.; ZALOUM, R. Biotechnologies applique'es a` la restauration de sites contamine's avec d'application d'une technique physico chimique et biologique pour les sols contamine's par des BPC. **Science et Techniques de l'Eau**, v. 23, p. 15-18, 1990.

SÁNCHEZ, M.; TERUEL, J.A.; ESPUNY, M.J.; MÁRQUES, A.; ARANDA, F.J.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 142, p. 118-127, 2006.

SCHNEIDER, J.; TARAZ, K.; BUDZIKIEWICZ, H.; DELEU, M.; THONART, P.; JACQUES, P. The structure of two fengycins from *Bacillus subtilis* S499. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 54, p. 859-865, 1999.

SCHWARZER, D.; MOOTZ, H.D.; LINNE, U.; MARAHIEL, M.A. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 14083-14088, 2002.

SEN, R.K. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 68, p. 263–270, 1997.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 714-724, 2008.

SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.27, p.110-116, 1987.

SHIH, I.-L.; KUO, C.-Y.; HSIEH, F.-C.; KAO, S.-S.; HSIEH, C. Use of surface methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 39, p. 635-643, 2008.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Applications aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 718-725, 2005.

SOLOMON, J.M.; GROSSMAN, A.D. Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. **Trends in Genetics**, v. 12, p. 150-155, 1996.

SULLIVAN, E.R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 263-269, 1998.

SUMI, H.; SASAKI, T.; YATAGAI, C.; KOZAKI, Y. Determination and properties of the fibrinolysis accelerating substance (FAS) in Japanese fermented soybean Natto. **Nippon No-gei Kagaku Kaishi**, v. 74, p. 1259-1264, 2000.

SUSSMAN, A.S. **Microrganismos: crescimento, nutrição e interação**. São Paulo: EDART, 1974.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845-857, 2005.

STELLER, S.; SOKOLL, A.; WILDE, C.; BERNARD, F.; FRANKE, P.; VATER, J. Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SfrD-thioesterase protein. **Biochemistry**, v. 43, p. 11331-11343, 2004.

THOMAS, D.W.; ITO, T. The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectrometry. **Tetrahedron**, v. 25, p. 1985–1990, 1969.

TSENG, C.C.; BRUNER, S.D.; KOHLI, R.M.; MARAHIEL, M.A.; WALSH, C.T.; SIEBER, S.A. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. **Biochemistry**, v. 41, p. 13350-13359, 2002.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin – A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **Journal of Antibiotics**, v. 39, ed. 7, p. 888-901, 1986.

VATER, P.J. Lipopeptides in food applications. In: KOSARIC, N. (Editor) **Biosurfactants – production, properties and applications**, New York: Dekker, 1986, p 419-446.

VATER, P.J.; STEIN, T.; VOLTENBROICH, D.; KRUF, V.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; FRANKE, P.; LIU, L.; ZUBER, P. The modular organization of multifunctional peptide synthetases. **Journal of Protein Chemistry**, v. 16, p. 557-564, 1997.

VATER, P.J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210-6219, 2002.

VEENANADIG, N.K.; GOWTHAMAN, M.K.; KARANTH, N.G.K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 95-99, 2000.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; ÖZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 44-49, 1997.

VOLPON, L.; TSAN, P.; MAJER, Z.; VASS, E.; HOLLOSI, M.; NOGUERA, V.; LANCELIN, J.M.; BESSON, F. NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin Lc reveals the strategic role of L-Asn1 in the natural iturinic antibiotics. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 67, p. 1374-1381, 2007.

VON MEIEN, O.F.; MITCHELL, D.A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 416-428, 2002.

WANG, Q.; CHEN, S.; ZHANG, J.; SUN, M.; LIU, Z.; YU, Z. Co-producing lipopeptides and poly- $\gamma$ -glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3318-3323, 2008.

WEI, Y.-H.; CHU, I.-M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 724-728, 1998.

WEI, Y.H.; CHOU, L.C.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

WEI, Y.-H.; LAI, C.-C.; CHANG, J.-S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC21332. **Process Biochemistry**, v. 42, p.40-45, 2007.

WHANG, L.M.; LIU, P.W.G.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 155-163, 2008.

WINKELMANN, G.; ALLGAJER, H.; LUPP, R.; JUNG, G. Iturin AL – a new long chain iturin a possessing an unusual high content of C16-beta-amino acids. **Journal of Antibiotics** (Tokyo), v. 36, p. 1451–1457, 1983.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095-2103, 2005.

YAO, M., WALKER, H.W.; LILLARD, D.A. Fatty acids from vegetative cells and spores of *Bacillus stearothermophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 102, p. 877-878, 1970.

YEH, E.; KOHLI, R.M.; BRUNER, S.D.; WALSH, C.T. Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. **ChemBioChem**, v. 5, p. 1290-1293, 2004.

YEH, M.-S.; WEI, Y.-H.; CHANG, J.-S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress Biochemistry**, v. 21, p. 1329–1334, 2005.

YEH, M.-S.; WEI, Y.-H.; CHANG, J.-S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1799-1805, 2006.



YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; McINEMEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiology Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **Critical Reviews in Biothechnology**, v. 1, p. 87-107, 1984.

ZHU, Y.; SMITS, J.P.; KNOL, W.; BOL, J. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 643-648, 1994.

ZHURAVLEVA, O.I.; AFIYATULLOV, S.S.; ERMAKOVA, S.P.; NEDASHKOVSKAYA, O.I.; DMITRENOK, P.S.; DENISENKO, V.A.; KUZNETSOVA, T.A. New C<sub>14</sub>-surfactin methyl ester from the marine bacterium *Bacillus pumilus* KMM 456. **Russian Chemical Bulletin**, v. 59, p. 2137-2142, 2010.

**APÊNDICE A – CURVA DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS EM  
ESTUDO**

O objetivo deste experimento foi verificar o perfil de crescimento dos microrganismos estudados para quantificar e padronizar o número de células inoculadas em cada cultivo. Foram coletados dados de  $D.O_{600}$  e de contagem de células viáveis (unidades formadoras de colônia,  $ufc.mL^{-1}$ ), os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras D1 e D2.

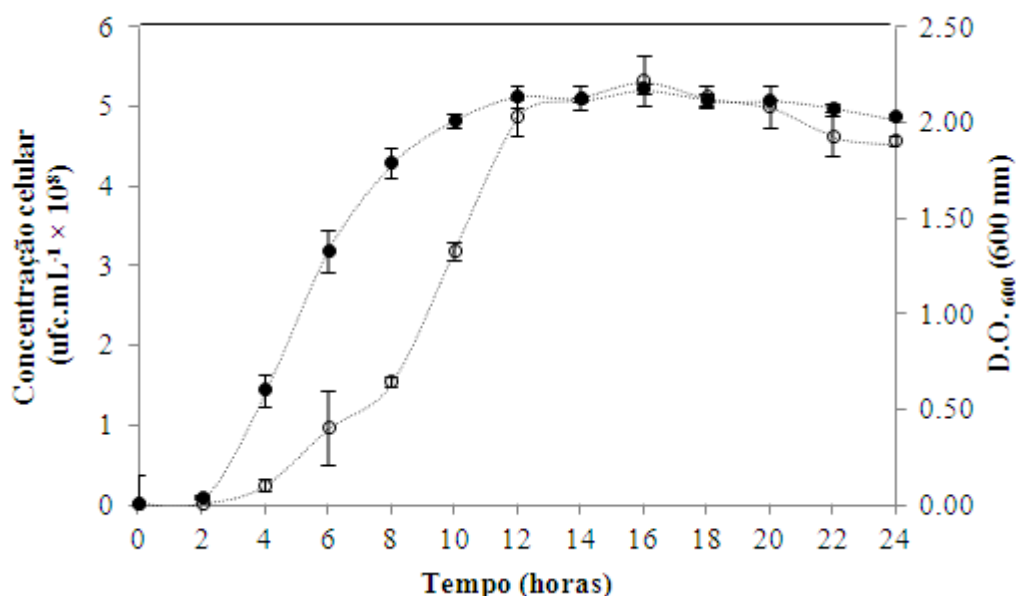


FIGURA A1. CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA DE *Bacillus* sp EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA. (○) contagem de células viáveis em câmara de Neubauer ( $ufc.mL^{-1} \times 10^8$ ); (●) medida da densidade óptica a 600 nm. O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 1000 mL com 100 mL de meio Luria Bertani Miller (LB-Miler) composto por 1 % (m/v) triptona, 1 % (m/v) NaCl e 0,5 % (m/v) extrato de levedura (experimento realizado em triplicata).

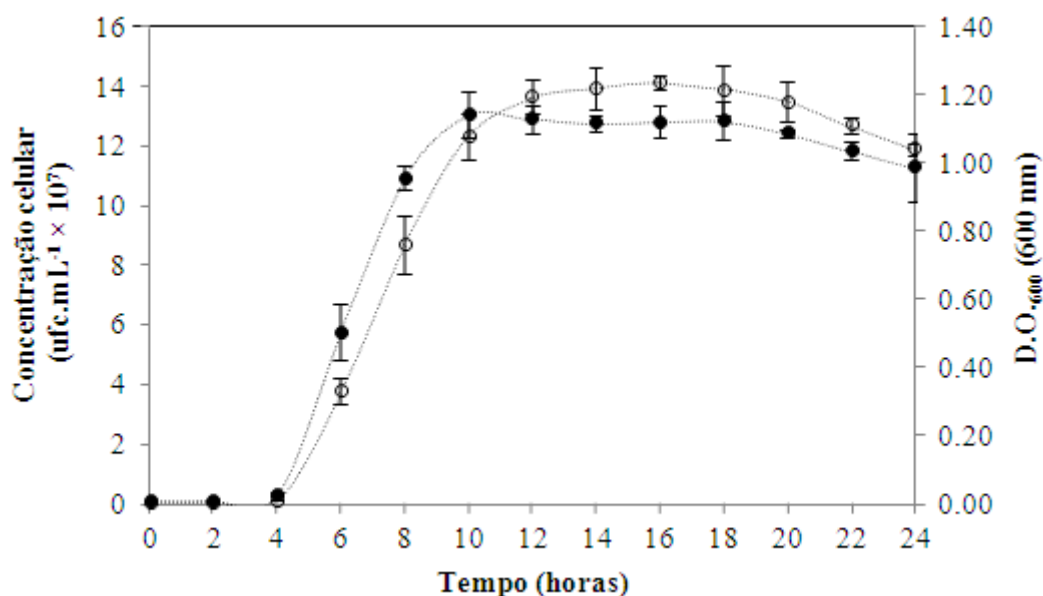

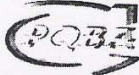


FIGURA A2. CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA DE *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA. (○) contagem de células viáveis em câmara de Neubauer ( $ufc.mL^{-1} \times 10^7$ ); (●) medida da densidade óptica a 600 nm. O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyers de 1000 mL com 100 mL de meio Luria Bertani Miller (LB-Miler) composto por 1 % (m/v) triptona, 1 % (m/v) NaCl e 0,5 % (m/v) extrato de levedura (experimento realizado em triplicata).

Pelos resultados apresentados é possível estabelecer uma relação quantitativa entre número de células viáveis e a absorbância do meio na fase exponencial de crescimento, demonstrando que a padronização do inóculo pelos valores de densidade óptica entre 0,8 – 1,0 são condizentes com a fase exponencial de crescimentos de ambos os microrganismos. Esta relação é importante porque permite a produção do pré-inóculo dos cultivos em condições onde o número de células seja alto ( $10^8$  ufc.mL<sup>-1</sup>) e as células sejam viáveis.

## **ANEXO A – IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS**

 UNICAMP FMQ-07 Emissão: CQT	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS <b>RELATÓRIO TÉCNICO</b>	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/3
	NÚMERO PROCESSO: CPQBA 238-09 DRM	
		PÁGINA: 2 de 7

### Identificação de Bactérias

#### 1. Objetivos

- Identificação molecular de linhagens bacterianas utilizando seqüenciamento e análise filogenética do gene RNA ribossomal 16S.

#### 2. Amostras analisadas

Serviço No.	Descrição da Amostra:
CPQBA 238-09 DRM 01	Uma placa contendo bactéria crescida em meio de cultura (Salpetro 2D)
CPQBA 238-09 DRM 02	Uma placa contendo bactéria crescida em meio de cultura (LTEB 01)

#### 3. Metodologia utilizada

- **Amplificação do gene RNA ribossomal 16S.** A metodologia consistiu na amplificação do gene RNA ribossomal 16S pela técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente das amostras. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram p27f e p1401r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.
- **Seqüenciamento.** Os produtos das amplificações foram purificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento usando o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os *primers* utilizados para o seqüenciamento foram p10f, 765f, 782r e p1100r.
- **Análise filogenética.** As seqüências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as seqüências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Foram então selecionadas seqüências de microrganismos relacionados ao microrganismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As seqüências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 4.0.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



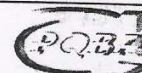


UNICAMP  
FMQ-07  
Emissão: CQT

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

### RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/3

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 238-09 DRM

PÁGINA: 3 de 7

#### 4. Resultados

- As colônias isoladas obtidas em cultivo em meio sólido (NA) apresentaram aspecto homogêneo, sem evidências de contaminação. A análise microscópica revelou a presença de bastonetes com coloração Gram positiva para a amostra **CPQBA 238-09 DRM 01** e a presença de bastonetes curtos com coloração Gram negativa para a amostra **CPQBA 238-09 DRM 02**.
- Os fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído das amostras. Os produtos das amplificações foram purificados em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento usando o sistema MegaBACE (GE Healthcare).
- As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas para as amostras **CPQBA 238-09 DRM 01 e DRM 02** estão apresentadas no Anexo I. As árvores filogenéticas construídas a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e das amostras **CPQBA 238-09 DRM 01 e DRM 02** estão apresentadas nas Figuras 1 e 2.
- Os resultados de identificação estão apresentados abaixo:

Amostra	Descrição do Serviço/Amostra	Identificação
CPQBA 238-09 DRM 01	Placa com crescimento bacteriano (Salpetro 2D)	<i>Bacillus</i> sp. Cohn 1872
CPQBA 238-09 DRM 02	Placa com crescimento bacteriano (LTEB 01)	<i>Burkholderia lata</i> Vanlaere et al. 2009

#### 5. Comentários

- A sequência parcial do gene RNAr 16S da amostra **CPQBA 238-09 DRM 01** apresentou entre 98 e 99% de similaridade com sequências de RNAr 16S de linhagens das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, contidas nas bases de dados consultadas.

A análise filogenética (Figura 1), entretanto, não evidenciou uma maior proximidade evolutiva da amostra **CPQBA 238-09 DRM 01** com nenhuma das linhagens tipo das espécies de *Bacillus* que apresentaram elevados níveis de similaridade de sequência. Portanto, não foi possível definir a identificação desta amostra em nível de espécie utilizando apenas a taxonomia molecular. Neste caso, o gene RNAr 16S não oferece resolução para discriminar estas espécies de *Bacillus*, as quais são filogeneticamente muito próximas entre si.

- A sequência parcial do gene RNAr 16S da amostra **CPQBA 238-09 DRM 02** apresentou 99% de similaridade com sequências de RNAr 16S das espécies *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia lata*, *Burkholderia cenocepacia* e de linhagens de *Burkholderia* sp. contidas nas bases de dados consultadas.

A análise filogenética (Figura 2) recuperou a amostra **CPQBA 238-09 DRM 02** em um agrupamento coeso suportado por alto valor de bootstrap (95%) juntamente com a linhagem tipo de *Burkholderia lata*, definindo a identificação da amostra em nível de espécie.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



UNICAMP

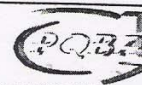
FMQ-07

Emissão: CQT

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

## RELATÓRIO TÉCNICO

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS  
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/3

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 238-09 DRM

PÁGINA: 4 de 7

## 6. Referências Bibliográficas

- Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Maidak, B.L.; Cole, J.R.; Lilburn, T.G.; Parker, C.T. Jr.; Saxman, P.R.; Farris, R.J.; Garrity, G.M.; Olsen, G.J.; Schmidt, T.M. & Tiedje, J.M. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* 29(1):173-174.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.


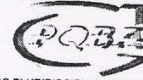
Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

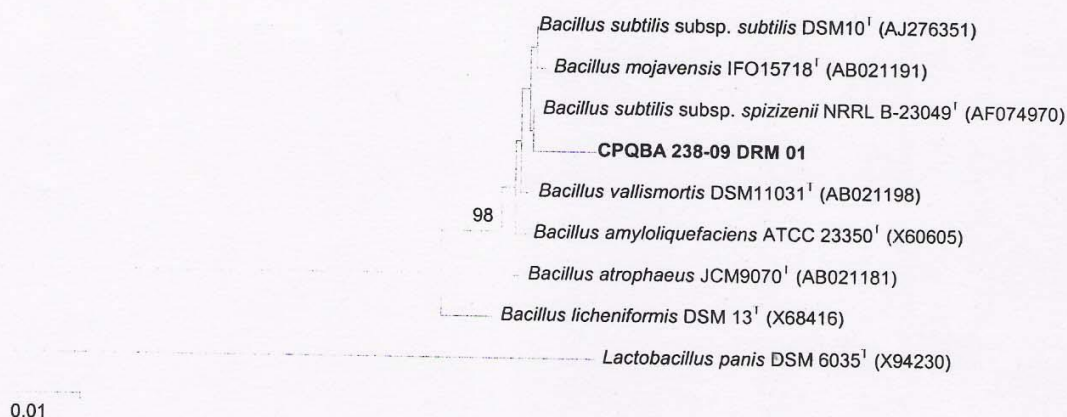
FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



 UNICAMP FMQ-07 Emissão: CQT	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS <b>RELATÓRIO TÉCNICO</b>	 CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS Edição/Revisão: 2/3
<b>NÚMERO PROCESSO: CPQBA 238-09 DRM</b>		<b>PÁGINA: 5 de 7</b>



**Figura 1.** Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra **CPQBA 238-09 DRM 01** e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e Genbank.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

**ANEXO B – DADOS DA CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E MOLECULAR DA  
SURFACTINA PRODUZIDA POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 EM  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

**Fonte:** BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização.** 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

Cópia integral das Seções 5.2.3.2 e 5.2.3.3 da dissertação, onde a autora discute os resultados de caracterização estrutural da surfactina produzida por *Bacillus pumilus*.

#### 5.2.3.2. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

As análises por ESI-MS no modo negativo forneceram a composição dos homólogos do biossurfactante produzido por *B. pumilus*, quando cultivado por FS (12 h), FS com Okara (24 h), FES com Okara puro (36 h) e com uma mistura de Okara e espuma de poliuretano (48h), tendo o glicerol como fonte de carbono nas quatro condições. Inicialmente, foram comparados os espectros dos homólogos do padrão surfactina (Figura 12a) e da mistura de homólogos produzida nas quatro melhores condições de produção citadas acima. A Figura 12b mostra o espectro obtido para os homólogos produzidos por FS (12 h). Os espectros para as demais condições estão no Anexo 1 (item 8.1).

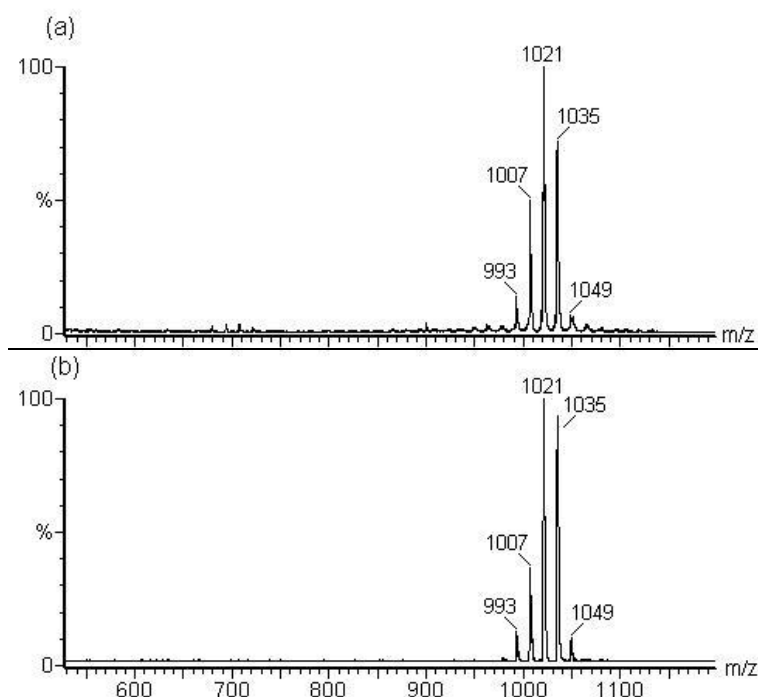


Figura 12. Homólogos presentes no biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448. Espectro de massa (ESI-MS), modo íon negativo, dos biossurfactantes: **(a)** Padrão surfactina (Sigma-Aldrich) produzida por *B. subtilis*; **(b)** Extrato bruto isolado do por *B. pumilus* UFPEDA 448, cultivado por 12 h em fermentação submersa tendo glicerol como fonte de carbono.

Na mistura de lipopeptídeos produzida por *B. pumilus* foram encontrados cinco diferentes compostos com mesmas massas molares para as quatro condições de cultivo, cujos picos são semelhantes aos do padrão surfactina. Este resultado indica que os compostos produzidos possuem a mesma massa molar do padrão. Esses compostos são prováveis homólogos da surfactina, ou seja, todos apresentam os mesmos aminoácidos, mas o tamanho da cadeia do ácido graxo varia de 12 a 16 carbonos.

Um outro resultado interessante obtido a partir dos espectros da ESI-MS refere-se à variação das proporções relativas dos cinco homólogos com a condição de cultivo utilizada (FS, FS com Okara, FES com Okara e FES com Okara e espuma de poliuretano). Estas proporções ou abundâncias relativas dos homólogos, calculadas de acordo com o descrito no item 3.6.3.2, estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Composição da mistura dos homólogos produzidos por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em diferentes condições de cultivo

Massas Moleculares <sup>1</sup>	Padrão de surfactina <sup>2</sup> (%)	Processo Fermentativo e Substrato Sólido			
		<sup>3</sup> (%)	<sup>3</sup> – Okara (%)	<sup>4</sup> – Okara (%)	<sup>4</sup> – Okara e espuma (%)
		2 h	24 h	36 h	48 h
<b>993</b>	5,1	6,8	2,5	2,6	4,5
<b>1007</b>	14,6	12,1	18,1	14,2	12,7
<b>1021</b>	39,5	38,0	37,4	30,5	19,1
<b>1035</b>	36,8	39,7	42,0	52,7	63,7
<b>1049</b>	4,0	3,4	0	0	0

<sup>1</sup>Homólogos analisados por ESI-MS, íon no modo negativo; <sup>2</sup>Padrão de surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* (Sigma); <sup>3</sup>FS: fermentação submersa; <sup>4</sup>FES: fermentação no estado sólido.

Verificou-se na Tabela 10 que a abundância dos homólogos e sua composição variaram de acordo com a condição de cultivo estudada e com o tempo de fermentação. Para as condições em que foi utilizado o Okara como substrato sólido, não houve a produção do homólogo referente à massa 1049 e os percentuais do homólogo 1035 foram mais elevados que os do padrão e do produzido por FS. Os dois homólogos mais abundantes nas quatro condições foram os que possuem massa molar de 1021 e 1035, mas a proporção deles variou consideravelmente conforme a condição de cultivo. O homólogo com massa molar 1021 diminui 19% da

FS para a FES utilizando Okara e espuma de poliuretano como substratos sólidos, enquanto o homólogo com massa molar 1035 aumentou 34%, nas mesmas condições citadas acima. Isto confirma que a composição do meio de cultura, bem como as condições de cultivo, podem influenciar significativamente na produção dos homólogos do biossurfactante (FICKERS *et al.*, 2008; MULLIGAN e GIBBS, 1993).

A maioria dos trabalhos que fazem a comparação entre a variação estrutural de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus*, dependendo da condição de cultivo, utiliza a mudança de temperatura na produção destes biossurfactantes como parâmetro de variação. Ohno *et al.* (1995) mostraram a dependência da temperatura na produção da Iturina A e da surfactina por *B. subtilis* RB14 utilizando o processo de FES e Okara como substrato. Esse estudo revelou que a produção máxima da iturina acontece em 25°C e da surfactina em 37°. Ainda pode-se notar que as proporções dos homólogos da iturina variaram com a mudança de temperatura. Dos cinco homólogos produzidos, a proporção do homólogo *n*-C<sub>14</sub> diminuiu (aproximadamente 15%) com o aumento da temperatura (23°C para 37°C) e uma tendência completamente oposta foi notada para o homólogo *n*-C<sub>16</sub>, que aumentou (de 5 para 25%) com o aumento da temperatura.

Fickers *et al.* (2008) também estudaram a influência da temperatura na produção de lipopeptídeos para duas cepas de *B. subtilis* (ATCC6633 e BBG100). O resultado obtido para ambas as cepas foi o mesmo: com o aumento da temperatura, houve o aumento do homólogo C<sub>16</sub> da micosubtilina (isoforma da família da iturina) e decréscimo do homólogo C<sub>17</sub>.

Os resultados da ESI-MS apresentados acima não elucidam detalhes estruturais, particularmente se a distribuição dos aminoácidos nos homólogos é também a mesma da surfactina. Para tanto, foi feita a fragmentação dos picos dos homólogos obtidos por ESI-MS, descrita a seguir.

#### 5.2.3.3. Elucidação estrutural do biossurfactante por fragmentação dos picos dos homólogos obtidos por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

Para a elucidação estrutural, foram realizadas análises nos extratos brutos das melhores condições de produção obtidas, as mesmas citadas no item anterior (4.2.3.2). Cada homólogo obtido foi fragmentado, porém, somente será apresentado o espectro obtido para o homólogo com massa 1021 da FS (12 h), composto mais abundante para esta condição. Os espectros dos demais homólogos da FS encontram-se no Anexo 1 (item 8.2).

Os resultados da fragmentação (Tabela 11) referentes aos homólogos de mesma massa, obtidos nas quatro condições distintas de produção [FS (12 h), FS com Okara (24 h), FES com Okara (36 h) e FES com Okara e espuma de poliuretano (48 h)], revelaram que as estruturas obtidas pelas diferentes formas de cultivo foram as mesmas, mudando apenas as abundâncias relativas de cada homólogo (vide item 4.2.3.2). Isto também foi observado por Das e Mukherjee (2007), que estudaram a produção de lipopeptídeos por *B. subtilis* por FS e FES e demonstraram que não houve diferença qualitativa na composição de biossurfactantes produzidos em ambos os sistemas.

As análises de fragmentação no modo positivo forneceram as estruturas dos homólogos (Tabela 11). A fragmentação dos lipopeptídeos por espectrometria de massas, para a posterior análise de sua seqüência de aminoácidos, foi realizada por meio do processo de dissociação induzida por colisão. Neste processo, os lipopeptídeos foram inicialmente introduzidos em uma região de vácuo do espectrômetro de massas por meio do processo de *electrospray*. Os lipopeptídeos ionizados foram acelerados para uma região do espectrômetro preenchida com um gás inerte (argônio) proporcionando, assim, a colisão entre os lipopeptídeos ionizados e as moléculas do gás inerte. Como resultado, a energia translacional transferida em cada colisão foi convertida em energia interna, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por consequência, induzindo a formação de dois íon-fragmentos, que são classificados como íons que retêm a carga residual no lado N-terminal (gerando fragmentos *-a*, *-b* e *-c*, dependendo da ligação que é fragmentada) e íons que retêm a carga residual na região C-terminal (gerando os fragmentos *-x*, *-y* e *-z*, dependendo da ligação que é

fragmentada), segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann. É importante enfatizar que os pares de íons  $-a/-x$ ,  $-b/-y$  e  $-c/-z$  serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas de menor energia, espera-se que a formação do par de fragmentos  $-b/-y$  seja mais freqüente que os demais pares de fragmentos, facilitando muito a interpretação dos espectros (CANTÚ *et al.*, 2008).

Analisando a Figura 13 e os dados da Tabela 11, pode-se perceber que os fragmentos  $-y$  (796, 667, 554, 441, 342, 227 e 114) e  $-b'$  (130, 243, 356, 455, 570, 683 e 796) são os mesmos para os cinco homólogos, pois são referentes à sequência peptídica. Com esse resultado, fica claro que a sequência peptídica é a mesma para todos os homólogos, ou seja, *B. pumilus* UFPEDA 448, mesmo em diferentes condições de cultivo, produz uma única isoforma com a mesma sequência peptídica e essa isoforma é a mesma da Surfactina A produzida por *B. subtilis* (VATER *et al.*, 2002).

Foram produzidos cinco homólogos no total e como a sequência peptídica é a mesma para todos os homólogos, a diferenciação só pode estar associada a variação do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo. Essa hipótese é comprovada pelos fragmentos  $-y'$  e  $-b$  (Figura 13 e Tabela 11), que são variáveis, pois possuem o ácido graxo junto ao fragmento. Cada um dos picos referentes aos fragmentos  $-y'$  e  $-b$  do homólogo 993, por exemplo, é maior que o pico correspondente do homólogo 1007 em 14 u. A diferença de massa molar é a mesma (14 u) entre os picos correspondentes do homólogo 1007 e 1021, entre o 1021 e o 1035 e entre o 1035 e o 1051. Com esses dados, pode-se concluir que a cadeia do ácido graxo varia de 12 a 16 átomos de carbono. Com essa análise, foi possível determinar o tamanho da cadeia carbônica, mas não há dados suficientes para determinar se ela é *n*, *iso* ou *anteiso*.

Quando a fragmentação ocorre simultaneamente nas posições amino e carboxi-terminal do mesmo resíduo de aminoácido, íons imônio são produzidos (CANTÚ *et al.*, 2008). O íon imônio referente à Leu possui massa de 86 e o pico referente a esse íon é visto em todos os espectros (Figura 13 e Anexo 1, item 8.2).

A Figura 13 mostra os íons esperados da fragmentação do homólogo 1021 e seu espectro de massa, comparado com o espectro do padrão da Surfactina A de *B. subtilis* (Sigma), comprovando a estrutura da Surfactina A e homólogo C<sub>14</sub>. Também

é esperado o fragmento referente à Leu-Asp-Val com massa 328, que não é mostrado na Figura 13. Os fragmentos esperados que não apareceram no espectro de massa foram assinalados com asterisco.

Tabela 11. Fragmentação dos homólogos da Surfactina A produzida por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448

Fragmentações	Homólogos				
	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>15</sub>	C <sub>16</sub>
$y_1$	114	114	114	114	114
$y_2$	227	227	227	227	227
$y_3$	342	342	342	342	342
$y_4$	441	441	441	441	441
$y_5$	554	554	554	554	554
$y_6$	667	667	667	667	667
$y_7$	796	796	796	796	796
$b_1$	198	212	226	240	254
$b_2$	328	342	356	370	384
$b_3$	441	455	469	483	497
$b_4$	554	568	582	596	610
$b_5$	653	667	681	695	709
$b_6$	768	782	796	810	824
$b_7$	881	895	909	923	937
$y_1'$	198	212	226	240	254
$y_2'$	310	324	338	352	366
$y_3'$	423	437	451	465	479
$y_4'$	538	552	566	580	594
$y_5'$	637	651	665	679	693
$y_6'$	750	764	778	792	806
$y_7'$	863	877	891	905	919
$b_1'$	130	130	130	130	130
$b_2'$	243	243	243	243	243
$b_3'$	356	356	356	356	356
$b_4'$	455	455	455	455	455
$b_5'$	570	570	570	570	570
$b_6'$	683	683	683	683	683
$b_7'$	796	796	796	796	796



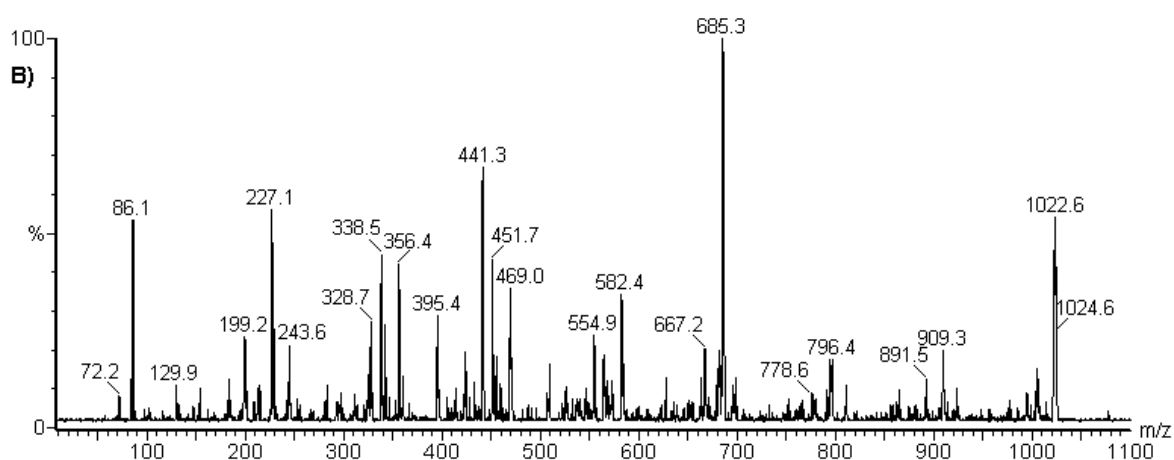
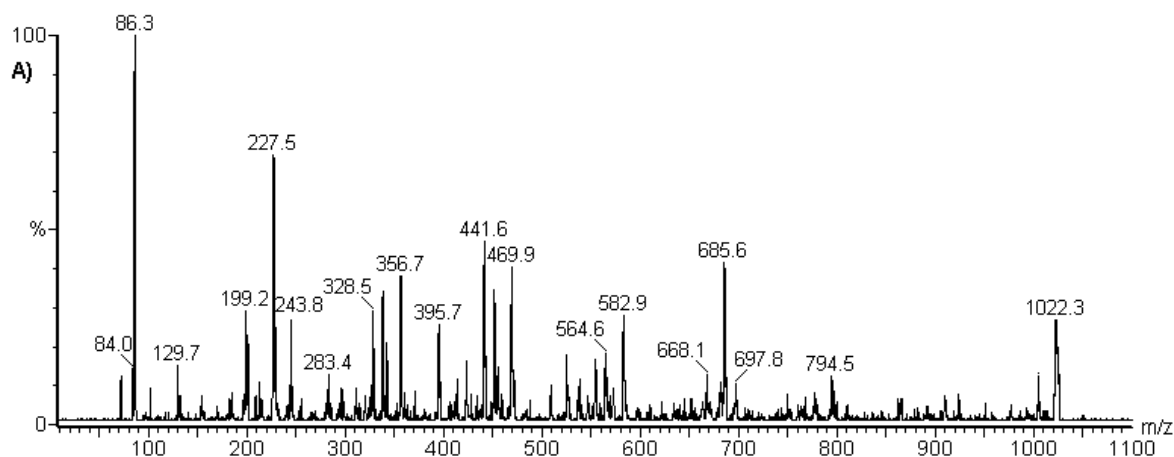
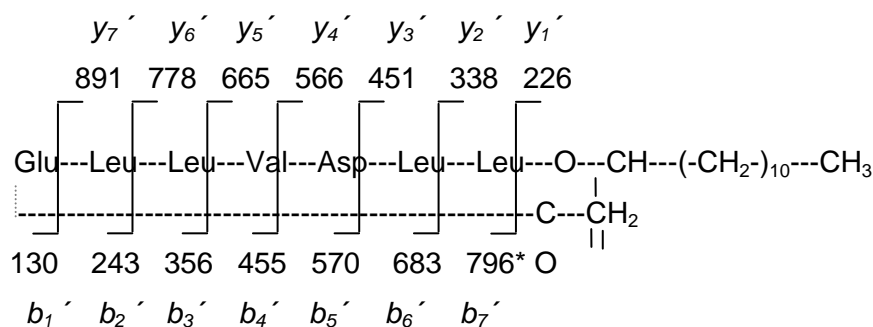
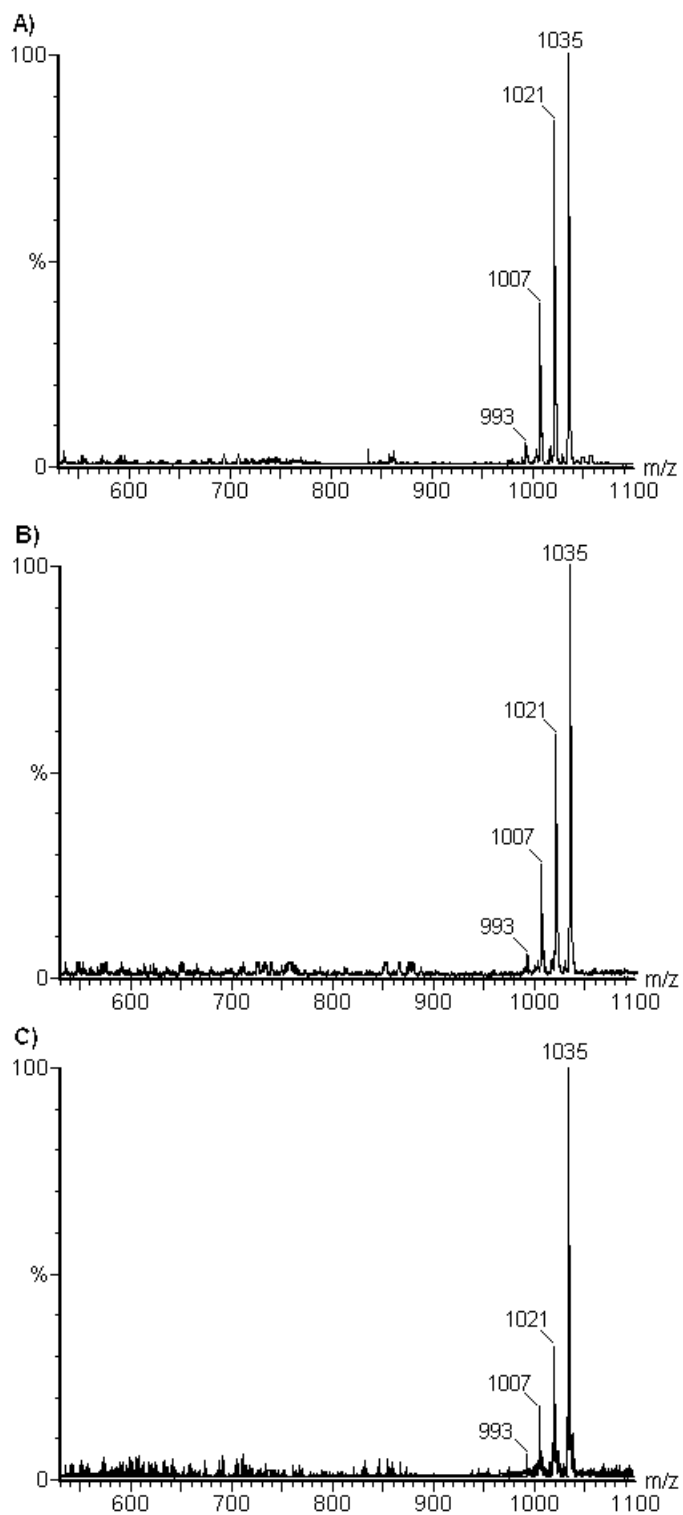


Figura 13. Íons esperados da fragmentação do homólogo C<sub>14</sub> da Surfactina A. **A)** Espectro de massa do padrão da surfactina produzido por *Bacillus subtilis*; **B)** Espectro de massa do homólogo C<sub>14</sub> produzido por *Bacillus pumilus*.

Morikawa *et al.* (1992) já haviam descrito que duas cepas de *B. pumilus* eram produtoras de surfactina, apresentando uma estrutura com massa molar de 1035 (Surfactina A, homólogo C<sub>15</sub>), confirmando os resultados aqui obtidos. Por outro lado, Hsieh *et al.* (2004) afirmaram, segundo seus estudos, que *B. pumilus* ATCC 7061 não é produtor de surfactina, dados que, segundo os autores, foram confirmados por PCR e CLAE.

Espectros obtidos para os homólogos produzidos por: **(A)** FS com Okara (24 h), **(B)** FES com Okara (36 h) e **(C)** FES com Okara e espuma de poliuretano (48 h).



**ANEXO C – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO OKARA E DO BAGAÇO DE  
CANA**



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR DE TECNOLOGIA

## CEPPA - CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

01/01

CENTRO POLITÉCNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA PP01  
CX. P. 19.083 - FONES: (41) 3366-3668 / 3361-3195 - FAX: (41) 3266-1647  
e-mail: ceppa@ufpr.br - www.ceppa.ufpr.br - CEP 81531-990 - CURITIBA - PARANÁ

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

Nº 128619

**PRODUTO:** OKARA 150 g – RESÍDUO SÓLIDO DA EXTRAÇÃO DO LEITE DE SOJA

**FABRICANTE/PRODUTOR:** Não consta

**SOLICITANTE:** Christiane Trevisan Slinvinski

**ENDEREÇO:** Rua Estevão Bayão, 90 Batel – Curitiba/PR

**PROTOCOLO DE RECEPÇÃO DE AMOSTRA Nº:** 188 – 11/02/11

**AMOSTRA:** 721/11

### Informações da amostra

Acondicionada em:	01 frasco plástico transparente	Temperatura:	Ambiente
Peso/Volume aproximado de:	150 gramas	Responsável pela coleta:	Solicitante

### RESULTADOS

#### PARÂMETRO FÍSICO-QUÍMICO

	Unidade de medida	Resultado
Umidade (1)	g/100g	8,87
Resíduo mineral fixo (2)	g/100g	3,76
Gordura total (3)	g/100g	4,73
Proteínas (N = 5,75) (4)	g/100g	29,49
Fibras alimentares (5)	g/100g	40,53
Carboidratos (6)	g/100g	12,62

#### METODOLOGIAS

- 1 AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 18.ed. Gaithersburg, 2010.
- 2 AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed. Gaithersburg, 2010.
- 3 AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed. Gaithersburg, 2010. (method 963.15).
- 4 AOAC. Official Methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, 2010. (Method 991.20).
- 5 AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed. Gaithersburg, 2010. (Method 985.29)
- 6 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 26 de dez. 2003. Seção I, p.33-34.

Dados do ensaio: Início: 14/02/11 Término: 11/03/11 Executora Técnica: Cintia L. Grevinski.

Curitiba, 17 de março de 2011.

/l

Jeyson Moreira Train  
Gerente Técnico  
CRN 18833 – 3ª Região

Cristina Mara Guolo  
Coordenadora do Laboratório  
CRF - 5891 PR

OBSERVAÇÃO: • A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA.

• AS INFORMAÇÕES CONSTANTES NESTE CERTIFICADO DE ANÁLISE SÃO CONFIDENCIAIS E PERTENCENTES AO SOLICITANTE.

• É PERMITIDA A REPRODUÇÃO, DESDE QUE INTEGRALMENTE E SEM NENHUMA ALTERAÇÃO.



# UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SETOR DE TECNOLOGIA

## CEPPA - CENTRO DE PESQUISA E PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

CENTRO POLITÉCNICO - PRÉDIO DAS USINAS PILOTO - BLOCO B - SALA PP01

CX. P. 19.083 - FONES: (41) 3366-3668 / 3361-3195 - FAX: (41) 3286-1647

e-mail: ceppa@ufpr.br - www.ceppa.ufpr.br - CEP 81531-990 - CURITIBA - PARANÁ

## CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 117220

PRODUTO: BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

FABRICANTE/PRODUTOR: -----X-----

SOLICITANTE: Nádia Krieger

ENDEREÇO: Centro Politécnico Curitiba/PR

PROTOCOLO DE RECEPÇÃO DE AMOSTRA Nº 376 - 19/03/09

AMOSTRA Nº 1056/09

### RESULTADOS

01/01

Descrição do produto: amostra recebida sob temperatura ambiente, acondicionada em 01 saco plástico transparente com peso aproximado de 170 g.

### PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Umidade (g/100 g) (1)	9,01
Resíduo mineral fixo (g/100g) (2)	2,04
Gordura Total (g/100 g) (3)	0,49
Proteínas (N x 5,75) (g/100 g) (4)	0,88
Fibras Alimentares (g/100g) (5)	88,20
Carboidratos (g/100 g) (6)	< 0,10

#### METODOLOGIAS

1 Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. Brasília, Anvisa 2005. (item 012/IV).

2 Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. Brasília, Anvisa 2005. (item 018/IV).

3 Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. Brasília, Anvisa 2005. (item 032/IV).

4 AOAC. Official Methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, 2005. (Method 991.20).

5 AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, 2005. (Method 985.29).

6 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 26 de dez. 2003. Seção 1, p.33-34.

Dados do ensaio: Início: 23/03/09 Término: 07/05/09

Responsáveis: Angelo Menegatti, Caroline Cristina Nunes e Michele Cristina Siewert.

Jeysor Moreira Trun  
Gestor Técnico  
CRN 188334 3ª Região

Curitiba, 07 de Maio de 2009

Cristina Mara Guolo  
CRE 5891/PR  
Coordenadora do Laboratório

RESERVAÇÃO: A PRESENTE ANÁLISE TEM SEU VALOR RESTRITO A AMOSTRA RECEBIDA PELO CEPPA.

AS INFORMAÇÕES CONSTANTES NESTE CERTIFICADO DE ANÁLISE SÃO CONFIDENCIAIS E PERTENCENTES AO SOLICITANTE.

É PERMITIDA A REPRODUÇÃO, DESDE QUE INTEGRALMENTE E SEM NENHUMA ALTERAÇÃO.



